

IAP5 Rec'd PCT/PTO 29 SEP 2005

明 細 書

プリオン病治療剤およびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、間葉系細胞、特に異常プリオン増殖阻害活性を有する間葉系細胞を有効成分とするプリオン病治療剤、およびその製造方法に関する。本発明はまた、異常プリオン増殖阻害活性を有する遺伝子が導入された細胞、特に間葉系細胞、およびその製造方法に関する。本発明はさらに、前記治療剤および／もしくは細胞、または抗プリオン抗体を用いたプリオン病治療法に関する。本発明はさらにまた、間葉系細胞を用いたプリオン病の病変部位に物質を送達するための剤にも関する。

背景技術

[0002] 現在、異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})の蓄積によって引き起こされるプリオン病に注目が集まっている。プリオン病は様々な動物種で見られ、ヒトのクールー、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病(GSS)、ヒツジおよびヤギのスクレイピー、ミンク伝染性脳症、シカ慢性消耗性疾患、ウシ海綿状脳症(BSE)、ネコ海綿状脳症などが知られている。いずれも発症までの潜伏期間が長く、神経細胞の脱落を伴う脳の萎縮が見られ、種々の神経症状を呈するという共通の特徴を持つ。

[0003] プリオンタンパク質は正常な細胞の表面に普通に存在するタンパク質である。正常なプリオンタンパク質(PrP^{C})と PrP^{Sc} は、同一のアミノ酸配列を持つがその立体構造が異なっており、その結果両者の生物学的、物理学的特性は全く異なったものとなっている。現在のところ、 PrP^{C} が PrP^{Sc} との接触により PrP^{Sc} に変化し、その結果 PrP^{Sc} が増殖し、神経細胞を変性させることでプリオン病が発症するという仮説が有力であるが、正確なメカニズムは未だ不明である。プリオン病は、 PrP^{Sc} の摂取または投与により種間バリアを超えて伝染する特性を有しており、中でもBSEのヒトへの感染が近年大きな問題となっている。

[0004] BSEは、 PrP^{Sc} を含むウシの特定部位の摂取などにより人体へ感染し、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)を発症する。vCJDは精神症状と高次機能障害(記憶

力低下、計算力低下、失見当識、行動異常、性格変化、無関心、不安、不眠、失認、幻覚など)で初発し、数ヶ月で痴呆、妄想、失行が急速に進行、さらに起立、歩行が不能になり、3～7ヶ月で無動性無言状態に陥り、1～2年で全身衰弱、呼吸麻痺、肺炎などで死亡する病気である。BSE感染によるvCJDは、2005年3月までに全世界で154例が報告されており、2005年2月4日には日本人初の感染者が報告されるなど、vCJDの影響は徐々に広がりを見せている。推移予測によると近未来には数千名から数万名の患者が発症すると推定されているため、日本においても将来的には少なくとも年間数万名の患者が予想される。

[0005] かかる状況を受けて、プリオン病の治療に関して様々な研究がなされているが、まだ有効な治療法が確立されていないのが現状である。

初期の研究においては、既知の化合物の中からプリオン病に有効なものを検索する試みがなされ、このうちアンホテリシンB(Xi YG et al. 1992. Nature 356(6370):598-601)、コンゴレッド(Caughey B et al. 1992. J Neurochem 59(2):768-71)、アントラサイクリン(Tagliavini F et al. 1997. Science 276(5315):1119-22)、キナクリン、チロロン、クロロキン、E-64dなどのシステインプロテアーゼ阻害剤(Doh-Ura K et al. 2000. J Virol 74(10):4894-7)、プロマジン、クロルプロマジン、アセプロマジンなどのフェノチアジン誘導体(Korth C et al. 2001. Proc Natl Acad Sci U S A 98(17):9836-41)、ポルフィリンやフタロシアニンなどのテトラピロール類(Caughey WS et al. 1998. Proc Natl Acad Sci U S A 95(21):12117-22)、ペントサンポリサルフェート、リアクティブ・グリーンおよびリアクティブ・レッドなどのリアクティブ・ダイ、キニーネ、8-ハイドロキシキノリン-2-カルボキサルデヒド8-キノリルヒドラゾン、2-ピリジンカルボキサルデヒド2-キノリルヒドラゾンおよび2, 2'-バイキノリンなどのキニーネ類(特開2003-40778号公報)などが、培養細胞や動物実験の結果から有効である可能性が示唆されていたが、その有用性は依然として確立されていない。

[0006] 特許文献1には、GAPDHの酸性アイソフォームを減少させ、および／または塩基性アイソフォームを増加させることで、PrP^c、ひいてはPrP^{Sc}の発現を抑制することができることに着目し、GAPDHのアンチセンス核酸またはデプレニルの投与によりプリ

オン病の予防および治療が可能であることが記載されている。しかし、かかる方法では、PrP^{Sc}の発生は減少するかもしれないが、同時にPrP^cの発現も抑制され、PrP^cの本来の機能の達成に支障が出る恐れがある。

- [0007] 非特許文献1には、PrP^cの変異体がドミナントネガティブ効果によりPrP^{Sc}の形成をin vitroで阻害したことが記載されており、プリオン病治療への有効性が示唆されているが、in vivoでの有効性はまだ確認されていない。

また、抗プリオン抗体がin vitroでPrP^{Sc}の形成を阻害し、in vivoにおいてもスクレイピーのモデルマウスにおいてPrP^{Sc}低減効果ならびに延命効果を有することが最近報告され(非特許文献2)、プリオン病の抗体療法が注目を集めたが、その後、抗プリオン抗体の投与により海馬および小脳のニューロンにアポトーシスが生じたことが報告されるなど(非特許文献3)、その有用性は依然不透明な状態にある。

- [0008] 以上の通り、精力的な研究が世界的に行われているにもかかわらず、現在のところプリオン病に有効な治療法は未だ存在せず、新たな治療剤や治療法の登場が強く求められていた。

特許文献1:特開2004-81034

特許文献2:国際公開第03/038074号パンフレット

非特許文献1:Kaneko K et al. 1997. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(19):10069-74

非特許文献2:White AR et al. 2003. Nature 422(6927):80-3

非特許文献3:Solforosi L et al. 2004. Science 303(5663):1514-6

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、プリオン病の治療に有効で、安全性の高い剤の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行ったところ、抗プリオン抗体をプリオン病モデルマウスに持続投与することにより、顕著な治療効果が得られることを見出した。さらに、上記抗体をコードする遺伝子を骨髄幹細胞に導入し、該遺伝子を発現させることに成功するとともに、骨髄幹細胞が患部に生着することを見出し、本発明を完成させた。

[0011] 即ち、本発明は、間葉系細胞を有効成分として含む、プリオン病の治療のための剤に関する。

本発明はまた、間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、上記剤に関する。

本発明はさらに、間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する抗プリオン抗体の遺伝子が導入されたものである、上記剤に関する。

本発明はさらにまた、抗体遺伝子が、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなり、抗体重鎖遺伝子が、

(1a)配列番号1、3、5、30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸、

(1b)遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1c)前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1d)前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、

(2a)配列番号2、4、6、31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸、

(2b)遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2c)前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2d)前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて

得た抗体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、上記剤に関する。

[0012] また、本発明は、静脈内投与用である、上記剤に関する。

さらに、本発明は、間葉系細胞が骨髄細胞、臍帯血細胞および末梢血細胞からなる群から選択される、上記剤に関する。

さらにまた、本発明は、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなる抗プリオン抗体遺伝子であって、抗体重鎖遺伝子が、

(1a)配列番号1、3、5、30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸

(1b)遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1c)前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1d)前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、

(2a)配列番号2、4、6、31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸

(2b)遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2c)前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2d)前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、前記抗プリオン抗体遺伝子に関する。

[0013] 本発明はまた、上記抗プリオン抗体遺伝子を含むベクターに関する。

本発明はさらに、RGD配列を含むアデノウイルスベクターである、上記ベクターに関する。

本発明はさらにまた、上記抗プリオン抗体遺伝子によりコードされる抗体の可変領域と、マウス以外の動物の抗体の定常領域とを含む、抗プリオンキメラ抗体に関する。

また、本発明は、(1a)配列番号30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸、

(1b) 遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1c) 前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1d) 前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される抗体重鎖遺伝子、および、

(2a) 配列番号31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸、

(2b) 遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2c) 前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2d) 前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される抗体軽鎖遺伝子によりコードされる、上記抗プリオンキメラ抗体に関する。

[0014] さらに、本発明は、上記抗プリオンキメラ抗体をコードする核酸に関する。

本発明はまた、細胞に、異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子を導入する

ことを含む、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法に関する。

本発明はさらに、異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子が、抗プリオン抗体遺伝子である、上記方法に関する。

本発明はさらにまた、細胞に、上記ベクターを介して、上記遺伝子を導入することを
含む、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法に関する。

また、本発明は、細胞が、間葉系細胞である、上記方法に関する。

さらに、本発明は、上記方法で作製された、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞に関する。

さらにまた、本発明は、上記方法を含む、プリオン病の治療のための剤の製造方法に関する。

[0015] 本発明はまた、抗プリオン抗体を放出する、プリオン病治療用持続製剤に関する。

本発明はさらに、抗プリオン抗体が、上記抗プリオン抗体遺伝子によりコードされる抗体、および／または、上記の抗プリオンキメラ抗体である、上記製剤に関する。

本発明はさらにまた、浸透圧ポンプの形態である、上記製剤に関する。

また、本発明は、抗プリオン抗体分泌細胞を含む、上記製剤に関する。

さらに、本発明は、抗プリオン抗体分泌細胞が、上記方法で作製された、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞である、上記製剤に関する。

さらにまた、本発明は、上記の剤、ベクター、抗プリオンキメラ抗体および製剤からなる群から選択される治療剤の治療有効量を投与することを含む、プリオン病を治療する方法に関する。

本発明はまた、抗プリオン抗体を持続放出することを含む、プリオン病を治療する方法に関する。

本発明はさらに、上記持続製剤および／またはベクターを投与することを含む、上記方法に関する。

本発明はまた、抗プリオン抗体遺伝子を対象の細胞に導入することを含む、上記方法に関する。

本発明はさらにまた、間葉系細胞の、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の製造への使用に関する。

また、本発明は、間葉系細胞を含む、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤に関する。

発明の効果

- [0016] 本発明の治療剤の投与または治療法により、これまで不可能と考えられてきたプリオン病の治療が可能となるので、医学および獣医学領域において多大な貢献が期待できる。しかも、本発明の剤に用いる間葉系細胞(間葉系幹細胞)は、骨髓、臍帯血または末梢血から作製することができるので、ES細胞を用いる場合のように倫理的な問題が生じることもなく、また、自己由来の細胞から容易に作製することができるので、投与の際も拒絶反応などの好ましくない生体反応を惹起するおそれが少ない。さらに、従来の治療剤が主としてPrP^{Sc}増殖抑制作用を有するのみで、症状の進行を遅延させることができるにすぎないところ、本願発明の剤は、かかる作用に加え、患部へ遊走した間葉系細胞がそこに定着し、自らが神経細胞へ分化して変性した神経組織を再建するので、症状の進行を遅らせるのみならず、症状を改善するという、従来の治療剤では到底不可能であった優れた効果を奏することができる。また、本発明の送達剤は、プリオン病の病変部位に治療剤や標識物質などの所望の物質を送達することができるので、プリオン病の治療のみならず、その研究や診断に大いに寄与するものである。本発明の上記効果は、例えば、本発明の治療剤をプリオン病モデルマウスに投与することにより容易に確認することができる。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1]抗体遺伝子とプライマーとの位置関係を示した模式図である。
[図2]抗体遺伝子の発現ベクターへのクローニング手順を示した模式図である。
[図3]抗体遺伝子をトランスフェクトした293T細胞による抗体の発現をウェスタンブロット法により評価した結果を示した図である。
[図4]抗体遺伝子をトランスフェクトした293T細胞により産生された抗体の、プリオンタンパク質への結合能を表したグラフである。
[図5]抗体遺伝子を含むコスミドの模式図である。
[図6]CD45(+)細胞およびCD45(-)細胞について行ったFACS分析の結果を示す図である。

[0018] [図7]CD45(+)細胞およびCD45(-)細胞の形態学的な違いを示した写真図である。

[図8]43C5抗体の遺伝子を含むアデノウイルスベクター Λ x43C5Hおよび Λ x43C5Lを同時感染させたICRマウスのMSCによる抗体遺伝子の発現をウェスタンブロット法により評価した結果を示した図である。レーン1はコントロール、レーン2は抗体遺伝子導入細胞である。

[図9]72-5抗体の遺伝子を含む発現ベクター(pC Δ cc/72-5HおよびpC Δ cc/72-5L)、または44B1抗体の遺伝子を含む発現ベクター(pC Δ cc/44B1HおよびpC Δ cc/44B1L)を導入したヒトおよびマウスMSCにより産生された抗体のアイソタイプを示す写真図である。

[図10]LacZ遺伝子を導入したICR/MSCをX-gal染色した結果を示した写真図である。

[図11]DsRed遺伝子を導入したヒトMSCまたはICR/MSCについて行ったFACS分析の結果を示す図である。

[0019] [図12]72-5抗体または44B1抗体を、所定期間プリオン病モデルマウスに脳内投与した後の脳組織の状態を示す写真図である。陰性対照としてKLHを用いた。

[図13]72-5抗体または44B1抗体を、所定期間プリオン病モデルマウスに脳内投与した後のPrP^{Sc}の蓄積量を、陰性対照であるKLH投与対象と比較した図である。図中の数値は、KLHを1.00とした場合の各抗体投与対象のPrP^{Sc}の蓄積量比を示す。

[図14]プリオン病モデルマウス(感染マウス)または正常ICRマウス(非感染マウス)における、LacZ発現MSCの移植後の状態を示した写真図である。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 本明細書中に別記のない限り、本発明に関して用いられる科学的および技術的用語は、当業者に通常理解されている意味を有するものとする。一般的に、本明細書中に記載された細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子およびタンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションに関して用いられる用語、およびその技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているもの

とする。一般的に、別記のない限り、本発明の方法および技術は、当該技術分野においてよく知られた慣用の方法に従って、本明細書中で引用され、議論されている種々の一般的な、およびより専門的な参考文献に記載されたとおりに行われる。かかる文献としては、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, および2000の補遺); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology – 4th Ed., Wiley & Sons (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); および Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)などが挙げられる。

[0021] 酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従い、当該技術分野において通常なされているとおりに、または本明細書に記載のとおりに行うものとする。本明細書中に記載された分析化学、合成有機化学ならびに医薬品化学および薬化学に関して用いられる用語、ならびにその実験手順および技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものである。標準的な技術を、化学合成、化学分析、薬剤の製造、製剤および送達、ならびに対象の処置に用いるものとする。

なお、本発明における用語「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、プリオン病の処置が企図される場合には、典型的には、該疾患に罹患している対象または実験的に罹患させた対象、例えばマウス、ラット、スナネズミ、モルモットなどの齧歯類、ネコ、ピューマ、トラなどのネコ科動物、シカ、オオシカなどのシカ科動物、ミンク、ヒツジ、ヤギ、ウシ、サル、ヒトなどである。

[0022] 本発明においては、間葉系細胞を有効成分として含む、プリオン病治療のための剤が提供される。

本発明において、プリオン病とは、PrP^{Sc}を病原とするあらゆる疾患を含む。かかる疾患としては、例えば、クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病(GSS)、ヒツジおよびヤギのスクレイピー、ミンク伝染性脳症、シカ慢性消耗性疾患、ウシ海綿状脳症(BSE)、ネコ海綿状脳症などが含まれるが、これらに限られない。上記疾患は、先天性または後天性(伝染性のものを含む)であってもよく、例えば、BSE感染牛の摂食により発症すると考えられる変異型CJD(vCJD)や、ヒト乾燥硬膜などの使用による医原性CJDも含まれる。また、本発明におけるプリオン病は、現在まだ知られていない、PrP^{Sc}を病原とする任意の疾患を包含する。

[0023] 本発明における間葉系細胞とは、好ましくは骨髄細胞(骨髄細胞の単画球分画成分)、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞、間葉系幹細胞、またはこれら細胞に由来する細胞等を指す。また、本発明の間葉系細胞には、例えば、間葉系に関連する細胞、中胚葉幹細胞等が含まれる。なお、本発明において「間葉系細胞」として記述された細胞が、将来的に間葉系細胞以外の細胞として分類される場合であっても、本発明においては当該細胞を好適に利用することができる。

[0024] 骨髄中には幹細胞として、造血幹細胞と「間葉系幹細胞(MSC: Mesenchymal Stem Cell)」とがある。ここで「幹細胞」とは、一般に、生体を構成する細胞の生理的な増殖・分化などの過程において、自己増殖能と、特定の機能を持つ細胞に分化する能力とを合わせ有する未分化細胞のことである。造血幹細胞は、赤血球、白血球、あるいは血小板に分化する幹細胞である。間葉系幹細胞は、神経幹細胞を経て神経に分化する場合、神経幹細胞を経ないで直接的に神経に分化する場合、ストローマ細胞を経て神経に分化する場合、内臓に分化する場合、血管系に分化する場合、または骨、軟骨、脂肪、あるいは筋肉に分化する場合があることが知られている。

[0025] 本発明では、主として間葉系幹細胞を利用するが、造血幹細胞や、体内の他の幹細胞(前駆細胞)を利用できる可能性があることにも言及しておく。間葉系幹細胞は骨髄から採取された骨髄細胞などから分離して得られる。なお、間葉系幹細胞を分離していない骨髄細胞も、有効性は若干劣るものの、間葉系幹細胞と同じように治療に用いることができる。

また、間葉系幹細胞のような細胞が、末梢血中から調製できる可能性も考えられる。実際、本発明者らは、末梢血のなかに混じっている細胞から培養してきた細胞を、神経幹細胞や神経系細胞(神経細胞、グリア細胞)のマーカを出現する細胞へ誘導できることに成功した。一方、本発明者らは既に、骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画から調製した中胚葉幹細胞(間葉系幹細胞)、またはES細胞を、基礎的培養液で培養すると、該中胚葉幹細胞(間葉系幹細胞)または該ES細胞が神経幹細胞、神経細胞またはグリア細胞へ分化誘導することを見出している(特許文献2参照)。したがって、末梢血中の細胞を培養することにより、間葉系幹細胞と同等の機能を有する細胞を調製し、本発明に利用することも可能である。

[0026] 本発明において、中胚葉幹細胞とは、発生学的に中胚葉と分類される組織を構成している細胞を指し、血液細胞も含まれる。また、中胚葉幹細胞とは、自己と同じ能力を持った細胞をコピー(分裂、増殖)することができ、中胚葉の組織を構成している全ての細胞へ分化し得る能力を持った細胞を指す。中胚葉幹細胞は、例えば、SH2(+), SH3(+), SH4(+), CD29(+), CD44(+), CD11b(-), CD14(-), CD34(-), CD45(-)の特徴を有する細胞であるが、これらマーカーに特に制限されない。また所謂、間葉系に関連する幹細胞も、本発明の中胚葉幹細胞に含まれる。

[0027] 上記の間葉系に関連する細胞とは、間葉系幹細胞、間葉系細胞、間葉系細胞の前駆細胞、間葉系細胞から由来する細胞のことを意味する。

間葉系幹細胞とは、例えば、骨髓、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、血液、臍帯血、更には、種々の組織の初期培養物から得ることができる幹細胞のことである。また末梢血中の細胞を培養して得ることができる間葉系幹細胞と同等の機能を有する細胞も本発明の間葉系幹細胞に含まれる。

本発明において好ましい間葉系細胞としては、骨髓細胞、骨髓幹細胞を好適に示すことができる。その他、本発明の細胞の好ましい例として、臍帯血細胞、末梢血細胞、胎児肝細胞等を挙げることができる。

[0028] 本発明における骨髓細胞、臍帯血細胞、末梢血細胞、胎児肝細胞の好ましい態様としては、骨髓、臍帯血、末梢血、または胎児肝より分離して得た細胞の一分画であ

って、神経系細胞へ分化し得る細胞を含む細胞分画を挙げることができる。

他の一つの態様において、該細胞分画は、SH2(+)、SH3(+)、SH4(+)、CD29(+)、CD44(+)、CD14(-)、CD34(-)、CD45(-)の特徴を有する中胚葉幹細胞を含む細胞分画である。

本発明において、上記以外の細胞分画の例としては、Lin(-)、Sca-1(+)、CD10(+)、CD11D(+)、CD44(+)、CD45(+)、CD71(+)、CD90(+)、CD105(+)、CDW123(+)、CD127(+)、CD164(+)、フィブロネクチン(+)、ALPH(+)、コラゲナーゼ-1(+))の特徴を有する間質細胞を含む細胞分画、あるいはAC133(+))の特徴を有する細胞を含む細胞分画を挙げることができる。

また、本発明においては、上記細胞分画に含まれる細胞は、神経系細胞へ分化し得る細胞であることが好ましい。

[0029] 本発明における細胞分画には、骨髓細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得ることを特徴とする細胞が含まれる。その他の態様として、例えば臍帯血細胞、末梢血細胞、または胎児肝細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得ることを特徴とする細胞が含まれる。その他の態様として、例えば活性物質や薬剤を用いて末梢血中に放出させられた骨髓中の間葉系幹細胞であって、神経系細胞へ分化し得ることを特徴とする細胞が含まれる。本発明の細胞分画に含まれる細胞の神経系細胞への分化は、いわゆる血液系細胞の神経系細胞への形質転換により生じるのか、それとも骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞などの中に存在する神経細胞に分化できる未熟な細胞の分化によるものであるかは明確ではないが、神経系細胞へ分化する細胞は、主として、幹細胞、即ち、自己増殖能と多分化能を有する細胞であると考えられる。また、神経系細胞へ分化する細胞は、ある程度他の胚葉へ分化している幹細胞であり得る。

[0030] 本発明の細胞分画に含まれる細胞は、栄養因子によって増殖することは要せず(栄養因子によって増殖することは可能である)、神経自己移植技術の開発という点では簡便で、かつ現実性の高いものであり、その医療産業上の有益性は多大なものであるといえる。本発明における骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞(細胞分画)は、一般的には、脊椎動物に由来する。好ましくは哺乳動物(例えば、マウス、ラ

ット、ウサギ、ミンク、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、シカ、ブタ、イヌ、サル、ヒトなど)由来であるが、特に制限されない。

[0031] 本発明における細胞分画は、例えば、脊椎動物から採取した骨髓細胞、臍帯血細胞を、2000rpmで比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07～1.1g/mlの範囲に含まれる一定の比重の細胞分画を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味し、通常10～30分間程度である。回収する細胞分画の比重は、好ましくは1.07～1.08g/mlの範囲、例えば、1.077g/mlである。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficol液やPercoll液を用いることができるがこれらに制限されない。また、脊椎動物から採取した臍帯血細胞を上記と同様に調製し、細胞分画として利用することもできる。

[0032] 具体例を示せば、まず、脊椎動物より採取した骨髓液(5～10 μ l)を溶液(1L-15を2ml+Ficolを3ml)に混合し、遠心(2000rpmで15分間)し、単核細胞分画(約1ml)を抽出する。この単核細胞分画を細胞の洗浄のために培養溶液(NPBM 2ml)に混合して、再度、遠心(2000rpmで15分間)する。次いで、上澄みを除去した後、沈降した細胞を回収する。本発明の細胞分画の採取源としては、大腿骨以外にも、胸骨や、骨盤を形成している腸骨から採取することもできる。これらの骨以外でも大きい骨であれば採取可能である。また、骨髓バンクに保存してある骨髓液や臍帯血から採取することも可能である。臍帯血細胞を利用する場合には、骨髓バンクに保存してある臍帯血から採取することも可能である。

[0033] 本発明の細胞分画の他の態様は、骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞より単離・精製して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得る中胚葉幹細胞(間葉系幹細胞)を含む細胞分画である。中胚葉幹細胞を含む細胞分画は、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞から遠心分離して得た上記の細胞分画の中から、上記SH2等の細胞表面マーカーを有する細胞を選択することにより得ることができる。

[0034] また、神経系細胞へ分化し得る中胚葉幹細胞(間葉系幹細胞)を含む細胞分画は

、脊椎動物から採取した骨髓細胞、臍帯血細胞を、900gで比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07～1.1g/mlの範囲に含まれる一定の比重の細胞分画を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味し、通常、10～30分間程度である。回収する細胞分画の比重は、細胞の由来する動物の種類(例えば、ヒト、ラット、マウス)により変動し得る。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficol液やPercol液を用いることができるが、これらに制限されない。

[0035] 具体例を示せば、まず、脊椎動物から採取した骨髓液(25ml)または臍帯血を同量のPBS溶液に混合し、遠心(900gで10分間)し、沈降細胞をPBSに混合して回収(細胞密度は 4×10^7 細胞/ml程度)することにより、血液成分を除去する。その後、そのうち5mlをPercol液(1.073g/ml)と混合し、遠心(900gで30分間)し、単核細胞分画を抽出する。細胞の洗浄のために、抽出した単核細胞分画を培養溶液(DMEM、10%FBS、1%anti-biotic-antimycotic solution)に混合し、遠心(2000rpmで15分間)する。次いで、遠心後の上澄みを除去し、沈降した細胞を回収し、培養する(37°C、5%CO₂ in air)。

[0036] 本発明の細胞分画の他の態様は、骨髓細胞、臍帯血細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化しうる間質細胞を含む細胞分画である。間質細胞は、例えば、Lin(-)、Sca-1(+)、CD10(+)、CD11D(+)、CD44(+)、CD45(+)、CD71(+)、CD90(+)、CD105(+)、CDW123(+)、CD127(+)、CD164(+)、フィブロネクチン(+)、ALPH(+)、コラーゲンナーゼ-1(+))の特徴を有する細胞である。間質細胞を含む細胞分画は、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞から遠心分離して得た上記の細胞分画の中から、上記Lin等の細胞表面マーカーを有する細胞を選択することにより得ることができる。

[0037] また、脊椎動物から採取した骨髓細胞、臍帯血細胞を、800gで比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07～1.1g/mlの範囲に含まれる一定の比重の細胞分画を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、

細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味し、通常、10～30分間程度である。回収する細胞分画の比重は、好ましくは1.07～1.08g/mlの範囲、例えば、1.077g/mlである。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficol液やPercol液を用いることができるがこれらに制限されない。

[0038] 具体例を示せば、まず、脊椎動物から採取した骨髄液または臍帯血を同量の溶液(PBS+2%BSA+0.6%クエン酸ナトリウム+1%ペニシリン-ストレプトマイシン)溶液に混合し、そのうちの5mlをFicol+Paque液(1.077g/ml)と混合し、遠心(800gで20分間)し、単核細胞分画を抽出する。この単核細胞分画を細胞の洗浄のために培養溶液(α MEM、12.5%FBS、12.5%ウマ血清、0.2% α -イノシトール、20mM葉酸、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、1 μ M ヒドロコルチゾン、1%anti-biotic-antimycotic solution)に混合し、遠心(2000rpm、15分間)する。次いで、遠心後の上澄みを除去した後、沈降した細胞を回収し、培養する(37°C、5%CO₂ in air)。

[0039] 本発明の細胞分画の他の態様は、骨髄細胞、臍帯血細胞、末梢血細胞、または胎児肝細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得るAC133(+)の特徴を有する細胞を含む細胞分画である。この細胞分画は、例えば、骨髄細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞から遠心分離して得た上記の細胞分画の中から、上記AC133(+)の細胞表面マーカーを有する細胞を選択することにより得ることができる。

また、その他の態様として、脊椎動物から採取した胎児肝細胞を、2000回転で比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07～1.1g/mlの範囲に含まれる細胞分画を回収し、この細胞分画から、AC133(+)の特徴を有する細胞を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味し、通常、10～30分間程度である。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficol液やPercol液を用いることができるがこれらに制限されない。

[0040] 具体例を示せば、まず、脊椎動物から採取した肝臓組織をL-15溶液内で洗浄し

、酵素処理(L-15+0.01%DNaseI、0.25%トリプシン、0.1%コラーゲナーゼを含む溶液中で、37℃で30分間)し、ピペッティングにより単一細胞にする。この単一細胞となった胎児肝細胞を遠心分離する。これにより得られた細胞を洗浄し、洗浄後の細胞からAC133抗体を利用してAC133(+)細胞を回収する。これにより胎児肝細胞から神経系細胞へ分化しうる細胞を調製することができる。抗体を利用したAC133(+)細胞の回収は、マグネットビーズを利用して、または、セルソーター(FACSなど)を利用して行うことができる。

[0041] これら中胚葉幹細胞(間葉系幹細胞)、間質細胞、あるいはAC133陽性細胞を含む細胞分画は、脊髄脱髄領域への移植後に、効率よく再髄化する。特に、上記中胚葉幹細胞(間葉系幹細胞)を含む細胞分画は、プリオン病モデルへ投与しても、良好に生着し、神経系細胞あるいはグリア細胞に分化することができる。

また、上記細胞分画に含まれる神経系細胞に分化し得る細胞として、例えば、上記細胞分画に含まれる神経幹細胞、中胚葉幹細胞(間葉系幹細胞)、および間質細胞、AC133陽性細胞が含まれるが、神経系細胞に分化し得る限り、これらに制限されない。

また、本発明におけるプリオン病の治療剤の有効成分としては、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞だけでなく、上記細胞分画も含まれる。

[0042] 本発明の剤に用いられる間葉系細胞、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞または末梢血細胞は、そのまま投与に用いることも可能であるが、治療効率を向上させるために、該細胞に種々の改変を加えることができる。したがって、本発明の別の側面では、かかる改変を受けた間葉系細胞を有効成分として含むプリオン病治療のための剤が提供される。

上記改変の例としては、該細胞へのPrP^{Sc}増殖阻害活性を付与するような遺伝子の導入が挙げられる。ここで、PrP^{Sc}増殖阻害活性とは、例えば、生体内におけるPrP^{Sc}の存在量の絶対的増加および／またはPrP^Cの存在量に対する相対的増加を抑制し、阻止し、あるいはPrP^{Sc}の存在量の絶対的および／または相対的減少をもたらすことができる能力を意味する。かかる効果は、直接的、または、間接的に達成されてもよいが、生体に好ましくない影響を与えないものが好ましい。また、上記活性は抑制の

程度の大きいものがより好ましく、PrP^{Sc}の存在量を減少させることができるものが最も好ましい。

[0043] PrP^{Sc}増殖阻害活性を付与し得る遺伝子としては、例えばPrP^{Sc}増殖阻害活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子などが挙げられる。かかるポリペプチドは、抗プリオン抗体、プロトカドヘリン43およびOB-カドヘリン-1などのカドヘリン(特表2000-512131号公報)、プラスミノゲン、プラスミノゲン断片およびその誘導体(特表2004-501626号公報)などを包含するが、これらに限定されるわけではない。

[0044] 本発明において、抗プリオン抗体とは、PrP^Cおよび/またはPrP^{Sc}に結合可能な抗体を意味する。本明細書においては、特に別記のない限り、用語「抗体」は、インタクトな免疫グロブリン、または、その抗原結合部分を包含する。抗原結合部分としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAbおよび相補性決定領域断片などが挙げられるが、PrP^Cおよび/またはPrP^{Sc}に結合可能なこれら以外の部分をも包含する。本発明に用いられる抗プリオン抗体はPrP^{Sc}増殖阻害活性を有するものが好ましく、例えば、非特許文献2、非特許文献3、Enari M et al. 2001. Proc Natl Acad Sci U S A 98(16):9295-9、Peretz D et al. 2001. Nature 412(6848):739-43、Gilch S et al. 2003. J Biol Chem 278(20):18524-31などに記載されたものや、いずれも独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、2001年9月14日に寄託されたハイブリドーマクローン72-5(受託番号:FERM P-18516)、および44B1(受託番号:FERM P-18515)により産生されるものなどが挙げられる。また、かかる活性を有することがまだ知られていないが、実際には当該活性を有する抗プリオン抗体も本発明に好適に用いることができる。このような抗体は、スクレイピー感染細胞株などを用いる評価系によってスクリーニングすることができる(上記Enari M et al.、Gilch S et al.などを参照)。

[0045] 本発明における抗プリオン抗体は、キメラ抗体、霊長類化抗体およびヒト化抗体を包含する。このような抗体はヒトにおいて免疫原性に乏しく、従って非ヒト動物からの抗体に比較して、ヒトへのin vivo投与に適している。抗プリオンキメラ抗体はこれまで知られておらず、本発明者らによって初めて作製されたものであり、勿論本発明に含まれる。典型的なキメラ抗体は、1種の動物、典型的にはヒトの定常領域に融合され

た別の動物、典型的にはマウスの免疫グロブリンの重鎖および／または軽鎖可変領域(CDRおよびFRを包含する)を含有するものであり、本発明においては、例えば、前記文献に記載のものや、ハイブリドーマクローン72-5および44B1などにより産生される抗プリオン抗体の可変領域にヒト抗体の定常領域を融合させたものなどが挙げられる。

[0046] 本発明の抗プリオンキメラ抗体の一態様としては、

(1a) 配列番号30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸、

(1b) 遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1c) 前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1d) 前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される抗体重鎖遺伝子、および、

(2a) 配列番号31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸、

(2b) 遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2c) 前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2d) 前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択される抗体軽鎖遺伝子によりコードされるものが挙げられる。

霊長類化およびヒト化抗体は、典型的には、非霊長類またはヒト抗体の可変領域フレームワーク中にグラフトされたマウス抗体からの重鎖および／または軽鎖CDRを包含し、通常ヒト定常領域をさらに包含する。

[0047] また、抗プリオン抗体またはその断片を新たに作製し、PrP^{Sc}増殖阻害活性につい

てスクリーニングすることで、本発明に有用な抗体を得ることも可能である。プリオンタンパク質は抗原性が極めて弱く、通常の免疫法では抗体を作製することが難しかったが、Buelerらによるプリオン遺伝子ノックアウトマウス(*Prnp*^{0/0}マウス)の開発(Bueler H et al. 1992. Nature 356(6370):577-82)により、同マウスをプリオンタンパク質またはそのエпитープを含む抗原で定法に従い免疫することによって、抗プリオン抗体を作製することが可能となった。もっとも、本発明においては、*Prnp*^{0/0}マウスを用いる以外の方法によって作製された抗プリオン抗体が除外されるわけではない。抗原としては、例えば、PrP^{Sc}感染組織のホモジネート、その精製物またはこれらの変性産物、プリオンタンパク質の一部のアミノ酸配列を含む合成ペプチド、組換えプリオンタンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0048] 抗プリオン抗体遺伝子のクローニングには、当該技術分野で周知の任意の技法を用いることができる。例えば、抗プリオン抗体産生細胞のRNAをもとにcDNAライブラリを構築し、抗体に特異的なプライマーを用いて、求める抗体遺伝子を得ることができる。より具体的には、例えば、抗体の定常領域に特異的なプライマーを作製し、RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法などの公知の手法により、未知の変換領域の核酸配列を含むポリヌクレオチドを得ることができるが、本発明の抗プリオン抗体遺伝子はかかる方法で得られるものに限られない。得られたポリヌクレオチドは、所定の制限酵素で消化し、任意の周知のベクターにクローニングすることができる。

[0049] 本発明で用いることができる抗プリオン抗体遺伝子としては、例えば、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなるものであって、抗体重鎖遺伝子が、
(1a) 配列番号1、3、5、30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸、
(1b) 遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(1c) 前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(1d) 前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を

有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、
(2a)配列番号2、4、6、31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸、
(2b)遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(2c)前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(2d)前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、 PrP^{Sc} 増殖阻害活性を有するものが挙げられる。

これらの遺伝子のうち、発現させた場合に PrP^{Sc} 増殖阻害活性のより高いものが本発明においては好ましい。

- [0050] 本明細書で用いる「ストリンジェントな条件」という用語は、当該技術分野において周知のパラメータである。核酸のハイブリダイゼーションのパラメータは、標準的なプロトコル集、例えばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001)や、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)などに記載されている。
- [0051] 具体的には、本明細書において用いるストリンジェントな条件は、65℃での、3.5×SSC、フィコール0.02%、ポリビニルピロリドン0.02%、ウシ血清アルブミン0.02%、 NaH_2PO_4 25mM (pH7)、SDS0.05%、EDTA2mMからなるハイブリダイゼーションバッファーによるハイブリダイゼーションを指す。なお、上記のうち、SSCは0.15M塩化ナトリウム/0.15Mクエン酸ナトリウム、pH7であり、SDSはドデシル硫酸ナトリウムであり、またEDTAはエチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーション後、DNAが移された膜は、2×SSCにて室温において、次いで0.1～0.5×SSC/0.1×SDSにて68℃までの温度において洗浄する。あるいは、ストリンジェント

なハイブリダイゼーションは、ExpressHyb(登録商標)緩衝液(Clontech社製)などの市販のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、製造者によって記載されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で行ってもよい。

[0052] 同程度のストリンジェンシーを生じる結果となる使用可能な他の条件、試薬等が存在するが、当業者はかかる条件に通じていると思われるため、これらについては、本明細書中に特段記載はしていない。しかしながら、本発明の変異体をコードしている核酸の相同体または対立遺伝子の明確な同定ができるよう、条件を操作することが可能である。

[0053] PrP^{Sc}増殖阻害活性を付与する遺伝子の間葉系細胞への導入に際しては、公知の種々の方法を用いることができる。例えば、該遺伝子をウイルスベクターに組み込み、該ベクターを間葉系細胞に感染させて導入する方法や、磷酸カルシウムトランスフェクション法(Berman et al. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7176)、DEAEーデキストラントランスフェクション、プロトプラスト融合(Deans et al. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1292)、電気穿孔(エレクトロポレーション)、リポソーム融合、ポリブレンによるトランスフェクションおよび細胞膜のレーザー微穿孔による遺伝子の直接的な送達を包含する、周知の多数の技法によって、上記遺伝子を間葉系細胞に導入することができる。当業者はまた、前記遺伝子を細胞のゲノムに組み込み、当該遺伝子の発現を可能にするように細胞内に適切に導入することのできる上記以外のいかなる技術をも本発明に用いることができる。

[0054] 本明細書に用いる場合、「ベクター」は、異なる遺伝的環境間の移送のため、または宿主細胞における発現のために、消化またはライゲーションによって所望の核酸分子を導入できる任意の核酸を意味する。ベクターは典型的にはDNAから構成されるが、RNAベクターを用いることもできる。ベクターは、プラスミド、ファージミド、およびウイルスゲノムを含むがこれに限定されるものではない。クローニングベクターは、自律的に、あるいはゲノムへの組み込みの後に、宿主細胞中で複製することができるものであり、それはさらに1または2以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によって特徴づけられ、当該ベクターはその部位で決定可能な様式で切断され、そこに所望の核酸配列を連結することができ、これにより、新規な組換えベクターは宿主中で目的とする

核酸分子を複製することが可能となる。プラスミドの場合には、宿主細菌内のプラスミドのコピー数が増えることにより、所望の核酸分子が何度も複製されもてよく、あるいは細胞分裂によって宿主が再生される前に宿主あたり1回だけ複製されてもよい。ファージの場合には、複製は溶菌相の間は積極的に、あるいは溶原相の間は受動的に起きてもよい。

[0055] 発現ベクターは、その中に所望の核酸配列が消化およびライゲーションにより挿入され、それが調節配列に対して作動可能に連結されて、転写物として発現されるようにするものである。

本発明に用いられる遺伝子は、1または2以上の遺伝子から構成されていてもよく、2以上の遺伝子から構成されている場合には、これらの遺伝子を単一の発現ベクターに挿入することも、また、2以上のベクターに分けて挿入することもできる。

発現ベクターはさらに、当該ベクターによって形質転換またはトランスフェクトされたか、またはされていない細胞を同定するのに適当な1または2以上のマーカー配列を含んでもよい。マーカーは、例えば抗生物質または他の化合物に対する抵抗性または感受性のどちらかを亢進または低下させるタンパク質をコードしている遺伝子、その活性が当該技術分野における標準的な分析法によって検出可能な酵素(例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、またはアルカリ性ホスファターゼ)をコードする遺伝子、および形質転換またはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニー、またはプラークの表現型に視覚的に影響する遺伝子を含む。好ましい発現ベクターは自律的な複製と、それに対してベクターが作動可能に連結されているDNAセグメントに存在する構造遺伝子産物の発現が可能なベクターである。

[0056] 本明細書においては、コード配列および調節配列は、当該コード配列の発現または転写が、当該調節配列の影響または支配下にあるように位置される様式において連結されている場合、「作動可能に」連結されているということとする。もし当該コード配列を機能的なタンパク質に翻訳することが望まれる場合には、2つのDNA配列は、もし5'調節配列におけるプロモーターによる誘導の結果、当該コード配列の転写が生じ、またもし当該2つのDNA配列の間の連結の性質が、(1)フレームシフト突然変異を誘導する結果とならず、(2)当該コード配列の転写を指示するための当該プロ

モーターの能力を妨害せず、あるいは(3)タンパク質に翻訳されるべき対応するRNA転写物の能力を妨害しない場合には、「作動可能に」連結されているといわれる。したがってプロモーター領域は、もし当該プロモーター領域が、結果として得られる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳されるように、そのDNA配列を転写できれば、作動可能にコード配列に連結されていることになる。

[0057] 本発明において有用なベクターは、所望により、例えば哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫遺伝子から誘導される適当な転写または翻訳調節配列と機能的に結合した本発明の変異体をコードしている核酸分子を含む。かかる調節配列は、遺伝子発現において調節的役割を有する配列、例えば転写プロモーターまたはエンハンサー、転写を調節するためのオペレーター配列、メッセンジャーRNA内部のリボゾーム結合部位をコードしている配列、ならびに、転写、翻訳開始または転写終了を調節する適切な配列を包含する。

[0058] 遺伝子発現に必要な調節配列の詳細な性質は、生物種または細胞種によって異なってもよいが、一般的には、少なくとも、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などの、各々転写および翻訳の開始に関与する5'非転写、および5'非翻訳配列を含み得る。特に、かかる5'非転写調節配列は、作動可能に連結された遺伝子の転写調節のためのプロモーター配列を含む、プロモーター領域を含み得る。調節配列はまた、エンハンサー配列か、または所望の上流のアクチベーター配列を含んでもよい。本発明のベクターは、任意に5'リーダーまたはシグナル配列を含んでもよい。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および自由裁量の範囲内にある。

[0059] 特に有用な調節配列は、種々の哺乳動物、ウイルス、微生物、および昆虫遺伝子由来のプロモーター領域を包含する。このプロモーター領域は、対象となる遺伝子の転写の開始を指令し、そして抗プリオン抗体遺伝子を含むDNAの全ての転写をもたらす。有用なプロモーター領域は、CAGプロモーター、レトロウイルスのdLTRプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー／プロモーター領域、RSVのLTRプロモーター、lacプロモーター、およびアデノウイルスから分離したプロモーターを包含するが、真核生物、原核生物、ウイルス、または微生物細胞での遺伝子発現に

有用な、当業者に公知の他の任意のプロモーターを用いることもできる。

[0060] 真核生物細胞内で、遺伝子およびタンパク質を発現するのにとりわけ有用なその他のプロモーターは、哺乳動物細胞プロモーター配列およびエンハンサー配列、例えばポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40ウイルス、およびヒトサイトメガロウイルスから誘導されるものを包含する。典型的にはSV40などのウイルスのウイルス複製起点に隣接して見出される、ウイルスの初期および後期プロモーターが、特に有用である。特定の有用なプロモーターの選択は、その細胞株、および、特定の細胞株内部で本発明の変異体を発現させるために使用する核酸構築物についての、他の様々なパラメータに依存する。さらに、本発明において有用な充分高いレベルで、標的細胞に遺伝子を発現させることが知られている任意のプロモーターを選択することができる。

[0061] 上記発現ベクターは、所望により、発現ベクターから生成されるmRNAの、タンパク質への効率的な翻訳を可能にするリボゾーム結合部位、PrP^{Sc}増殖阻害活性を付与する遺伝子に機能的に結合していてもよい種々のシグナルペプチドをコードしている核酸配列を包含する、種々のさらなる調節配列を含むことができる。シグナルペプチドは、もし存在するならば、翻訳されたポリペプチドの細胞外分泌の改善を可能にする前駆体アミノ酸として発現される。

したがって、本発明の核酸構築物は、プロモーター配列またはプロモーターおよびエンハンサー配列のいずれかと作動可能に結合し、さらにmRNAの終止およびポリアデニル化を指令するポリアデニル化配列に機能的に結合した、本発明の核酸分子の様々な型を包含する。本発明の核酸構築物は、所望の細胞内部でのその構築物の効率的な複製および発現を可能にするその他の遺伝子配列を含み得る。かかる配列は、ウイルス遺伝子等から誘導されるイントロンを包含し得る。

[0062] 本発明において、間葉系細胞への遺伝子導入に好適に用いることができるウイルスベクターとしては、例えば、特開2002-330789号公報に記載の改変アデノウイルスが挙げられる。該アデノウイルスは、野生型アデノウイルスに対する主要なレセプターであるCAR(コクサッキーアデノウイルスレセプター)との結合能を実質的に有しないファイバータンパク質に、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異

性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および／または、実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質を有するものであるが、本発明においては、実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質にRGD(Arg-Gly-Asp)モチーフを含む分子を接続した改変ファイバータンパク質を有するものが特に好ましい。

[0063] かかる改変アデノウイルスベクターは、当該技術分野で周知の分子生物学的手法、例えば、ウイルスゲノムの両端に共有結合した末端タンパク質を保持したままの、ゲノム-末端タンパク質複合体(以下DNA-TPCと略す)を用いる方法(Yoshida et al. 1998. Hum Gene Ther 9:2503-2515等を参照)などによって作製することができる。かかる手法はいずれも当業者に良く知られたものである。典型的には、まず、p Δ x Cw、p Δ xC Δ w Δ 等のコスミドカセットに目的とする遺伝子を組み込んだコスミドを作製する一方、ウイルスからDNA-TPCを調製し、適当な制限酵素で切断しておく。次に、前述のコスミドおよび制限酵素処理したDNA-TPCを適切な宿主細胞、例えば293細胞にコトランスフェクトする。その後、適当な条件で一定期間培養し、培養液中にウイルス粒子として放出された組換えアデノウイルス粒子を回収することができる。

[0064] 本発明に用いられる間葉系細胞には、上記の他、例えば、細胞の増殖や神経細胞への分化を促進する遺伝子、細胞の生存率を高める遺伝子、細胞の寿命を延長する遺伝子(例えばテロメラーゼ遺伝子:国際公開第03/038075号パンフレット参照)、細胞周期を調節する遺伝子、細胞の遊走能を向上させる遺伝子、神経保護作用を有する遺伝子、アポトーシス抑制効果を有する遺伝子など、プリオン病の治療効果を高める効果を有する任意の遺伝子を導入することができる。

なお、間葉系細胞についてなされる上記改変は、他の任意の種類の細胞についても適宜行うことができ、こうして作製された改変細胞を、異常プリオンの増殖を阻害するために用いることもできる。かかる改変細胞も本発明に包含されるものとする。

[0065] 本発明のプリオン病治療剤は、プリオン病の治療効果を高める効果を有する種々の物質を添加した剤(組成物)として投与することができる。かかる物質としては、例えばPrP^{Sc}増殖阻害活性を有するものが挙げられる。PrP^{Sc}増殖阻害物質の例としては

、アンホテリシンB、コンゴレッド、アントラサイクリン、キナクリン、チロン、クロロキン、E-64dなどのシステインプロテアーゼ阻害剤(上記Doh-Ura K et al.)、プロマジン、クロルプロマジン、アセプロマジンなどのフェノチアジン誘導体(上記Korth C et al.)、ポルフィリンやフタロシアニンなどのテトラピロール類(上記Caughey WS et al.)、ペントサンポリサルフェート、リアクティブ・グリーンおよびリアクティブ・レッドなどのリアクティブ・ダイ、キニーネ、8-ハイドロキシキノリン-2-カルボクسالデヒド8-キノリルヒドラゾン、2-ピリヂンカルボクソアルデヒド2-キノリルヒドラゾンおよび2, 2'-バイキノリンなどのキニーネ類(特開2003-40778号公報)などの化合物、PrP^cのドミナントネガティブ変異体をコードする遺伝子構築物(非特許文献1)、ならびに、PrP^cおよび/またはPrP^{Sc}に結合する物質などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0066] PrP^cおよび/またはPrP^{Sc}に結合する物質には、抗プリオン抗体またはその断片(例えば、非特許文献2、非特許文献3、特開2003-144148号公報、特開2003-321498号公報、上記Enari M et al.、上記Peretz D et al.、上記Gilch S et al.などを参照)、プロトカドヘリン43およびOB-カドヘリン-1などのカドヘリン(特表2000-51213号公報)、プラスミノゲン、プラスミノゲン断片およびその誘導体(特表2004-501626号公報)などが挙げられるが、このうちPrP^{Sc}増殖阻害活性を有するものが好ましい。

[0067] また、ある物質がPrP^{Sc}増殖阻害活性を有するか否かは、特開2003-149237号公報などに記載された周知の方法を用いて決定することができ、かかる方法によって同定された任意のPrP^{Sc}増殖阻害物質(例えば、クロロフィルa、クロロフィルb、銅クロロフィル、銅クロロフィリンナトリウム、鉄クロロフィリンナトリウムなど)を、本発明の剤に用いることができる。

プリオン病の治療効果を高める効果を有する物質としては、上記の他、例えば細胞の増殖や神経細胞への分化を促進する物質、細胞の生存率を高める物質、細胞の寿命を延長する物質、細胞周期を調節する物質、細胞の遊走能を向上させる物質、神経保護作用を有する物質、アポトーシス抑制効果を有する物質などが包含される。

[0068] 本発明の治療剤の調製に際しては、前記のようにして作製した間葉系細胞(改変されたものを含む)をそのまま用いることもできるが、細胞を作製し、必要に応じて増殖させた後、これを凍結保存し、用事に解凍して治療剤の調製に用いることもできる。

本発明のプリオン治療剤は、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、必要に応じて水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。また、注射のための無菌組成物は注射用蒸留水などのビヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

[0069] 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムなどが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50などと併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプル、バイアル、チューブ、ボトル、パックなどの容器に充填する。

[0070] 対象の体内への投与はいずれの経路によってもよいが、好ましくは非経口投与であり、特に好ましくは局所投与または静脈内投与である。投与回数は1回が好ましいが、状況に応じて複数回投与することもできる。また、投与時間は短時間でも長時間持続投与でもよい。本発明の治療剤は、より具体的には、注射によりまたは経皮的に投与することができる。注射による投与の例としては、例えば、静脈内注射、動脈内注射、選択的動脈内注入、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、脳室内注射、脳

内注射、髄液腔内注射などによるものが挙げられるが、これらに限られない。

静脈内注射の場合、通常の輸血の要領での投与が可能となり、対象を手術する必要がなく、さらに局所麻酔も必要ないため、対象および術者双方の負担を軽減することができる。また手術室以外での投与操作が可能である点で有利である。

本発明の抗プリオンキメラ抗体やベクターも、上記と同様の方法によって調剤し、投与することができる。

[0071] さらに本発明は、対象へ治療上有効量の本発明の治療剤、ベクター、抗プリオンキメラ抗体、および／または、以下で詳述する持続製剤を投与することを含む、プリオン病の治療方法に関する。

上記治療方法に用いられる剤に含まれる骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞等の間葉系細胞は、投与による拒絶反応の危険性を防止するために、免疫抑制などの特殊な操作を行わない限りは、対象自身の体内から採取されたもの、あるいはそれに由来するもの(対象由来の自家細胞)であることが好ましい(自家移植療法)。かかる態様は、免疫抑制剤の併用が回避できる点で好ましい。免疫抑制処置を行えば他家細胞の使用も可能であるが、自家細胞を用いる方が圧倒的に良好な治療効果が期待できる。

[0072] 自家細胞の使用が困難な場合には、他の対象または他の医療用動物由来の細胞を利用することも可能である。細胞は冷凍保存したものであってもよい。

なお前記自家細胞は、対象の体内から未分化の状態で採取されたもの、対象の体内から未分化の状態で採取された間葉系幹細胞に遺伝子操作を加えたもの、または対象の体内から未分化の状態で採取された間葉系幹細胞を分化誘導させたもののいずれであってもよい。

また、本発明の治療方法において、本発明の剤(間葉系細胞、例えば骨髓細胞等を含むもの)の対象への投与は、例えば、上述の方法に従って、好適に実施することができる。また、医師または獣医師においては、上記方法を適宜改変して、本発明の剤を対象へ投与することが可能である。

また、本発明の上記治療方法の対象は必ずしもヒトのみに限定されない。通常、ヒト以外の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、スナネズミ、モルモットなどの齧歯類、ネコ、

ピューマ、トラなどのネコ科動物、シカ、オオシカなどのシカ科動物、ミンク、ヒツジ、ヤギ、ウシ、サルなど)においても間葉系細胞を用いて、同様に本発明の方法を実施することが可能である。

[0073] 本発明の他の側面は、治療上有効量の抗プリオン抗体を持続放出することを含む、プリオン病の治療方法、ならびにかかる治療方法に用いる持続製剤に関する。

持続放出は、任意の持続製剤を用いて達成することができ、典型的には対象の体内で行われるが、これに限定されず、例えば、体外もしくは体表に設置した持続製剤もしくは持続放出デバイスを介して行うこともできる。持続製剤の例としては、浸透圧ポンプや、造形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態にある半透性ポリマーマトリックスなどが挙げられる。浸透圧ポンプとしては、例えばDURECT社のAlzet (登録商標) 浸透圧ポンプなどを好適に用いることができる。同ポンプは内部に含まれた溶液を所定の流量パターンで放出することができるため、抗プリオン抗体を、生理学的に許容し得る溶媒、例えば生理食塩水、PBSなどに溶解して所望の放出特性を有するポンプに充填し、これを体内に設置することで、容易に抗体の持続放出を達成できる。持続放出性マトリックスとしては、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号および欧州特許第58481号)、L-グルタミン酸およびガンマーエチルーL-グルタメートのコポリマー(Sidman, U. et al., Biopolymers 22:547-556 (1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981)、およびR. Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982))、エチレンビニルアセテート(上記R. Langer et al.)、またはポリ-D-(+)-3-ヒドロキシ酪酸(特開昭60-54326号公報)などが挙げられる。持続製剤はまた、リポソームエントラップポリペプチドを包含する。抗プリオン抗体を含有するリポソームは、自体公知の方法により調製される(例えば、Epstein et al. 1985. Proc Natl Acad Sci USA 82:3688-3692、Hwang et al. 1980. Proc Natl Acad Sci USA 77:4030-4034などを参照)。通常、リポソームは、小さい(約200~800オングストローム)単層型であり、その脂質含量は、約30mol%のコレステロールよりも高く、選択比率は、最適な抗体治療に関して調節される。

[0074] 本発明の持続製剤はまた、抗プリオン抗体を分泌する細胞を含むことができる。かかる細胞には、例えば、クローン44B1や72-5などの抗プリオン抗体産生ハイブリド

一マばかりでなく、抗プリオン抗体遺伝子を導入した任意の細胞が含まれる。かかる細胞を含む持続製剤は、細胞が生存する限り抗体を放出することができるため、侵襲的な方法を伴い得る製剤導入の頻度を減らすことが可能となり、有利である。このような細胞のうち、生体への悪影響の少ない自己由来の細胞が好ましく、また、増殖や生死が制御可能な細胞も好ましい。本発明の持続製剤において特に好ましい細胞は、抗プリオン抗体遺伝子が導入された間葉系細胞、より好ましくは間葉系幹細胞であり、かかる細胞を投与することにより、抗プリオン抗体が持続的に放出されるだけでなく、該細胞が損傷した神経組織が再建されるため、相乗的な効果が期待できる。上記細胞には、例えば、細胞の増殖や神経細胞への分化を促進する遺伝子、細胞の生存率を高める遺伝子、細胞の寿命を延長する遺伝子（例えばテロメラーゼ遺伝子）、細胞周期を調節する遺伝子、細胞の遊走能を向上させる遺伝子、神経保護作用を有する遺伝子、アポトーシス抑制効果を有する遺伝子など、プリオン病の治療効果を高める効果を有する任意の遺伝子を導入することができる。

抗プリオン抗体分泌細胞を含む上記製剤は、例えば、生理食塩水、PBS、種々の細胞培養培地などの生理学的に許容し得る媒体中に上記細胞を含む懸濁液として、または、かかる懸濁液を生分解性カプセル中に含むカプセル剤として提供することができる。また、上記細胞は、凍結保存し用事に解凍して使用してもよい。その他の製剤化の例は、本発明の治療剤についてすでに記載した通りであり、当業者に公知である。

- [0075] 本発明の持続製剤は、体内の任意の部分、例えば、皮下組織中、筋肉内、腹腔内、脳内、脳室内、髄液腔内、動脈内、静脈内などに定法により導入することができる。放出期間は、プリオン病の進行の遅延または病態の改善がもたらされるものであれば特に限定されないが、例えば、10～50日の期間であれば、良好な治療効果を得ることができる。また、放出量も、プリオン病の進行の遅延または病態の改善がもたらされるものであれば特に制限されないが、典型的には0.01～100mg/kg/日であり、好ましくは0.1～10mg/kg/日、より好ましくは0.5～5mg/kg/日である。抗プリオン抗体分泌細胞を含む製剤を用いる場合、投与量は、細胞の抗体産生能にもよるが、典型的には $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/kg(局所投与)または $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$

細胞/kg(静脈内投与)であり、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/kg(局所投与)または $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/kg(静脈内投与)、より好ましくは $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/kg(局所投与)または $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/kg(静脈内投与)である。ただし、かかる用量は、治療における種々の条件、例えば、疾患の重篤度、対象の一般健康状態、年齢、体重、性別、食事、製剤の投与経路、投与時期および投与頻度、併用医薬の有無、反応への感受性、および治療に対する耐容/応答などに応じて適宜調節することができる。

- [0076] 本発明の当該側面の治療方法はまた、抗プリオン抗体遺伝子を対象の細胞に導入することを含む。抗プリオン抗体遺伝子が導入された細胞は、抗プリオン抗体を持続的に放出するようになるため、本発明の持続製剤として作用することができる。核酸分子を対象の所望の細胞内に導入する方法は良く知られており、これは、ベクターの使用および対象への様々な核酸構築物の注入などを包含する。導入される細胞としては、プリオン病改善効果が得られれば特に制限されないが、典型的には対象の脳内に存在する細胞を挙げることができる。

遺伝子を適切に送達し、所望の核酸分子の発現をもたらすことのできる数多くの種類のベクターが開発され、例えば、Current Comm. Mol. Biol., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1987)などの文献に記載されている。抗プリオン抗体遺伝子を含むベクターとしては、当該文献に記載されているもののほか、上述の種々のものを好適に用いることができる。ベクターを用いる場合、典型的には、本発明の核酸分子を含むベクターの治療有効量を、対象の循環内または局所に導入し、該ベクターが所望の細胞に特異的に感染できるようにする。別の好ましい態様では、ベクターを、対象の脳内に直接注入する。ベクターの投与量は、プリオン病の改善がもたらされる量であれば特に制限されないが、本発明のアデノウイルスベクターであれば、例えば成人1人あたりウイルス粒子 $10^3 \sim 10^{15}$ 個を投与することができる。ただし、かかる用量は、治療における種々の条件、例えば、疾患の重篤度、対象の一般健康状態、年齢、体重、性別、食事、製剤の投与経路、投与時期および投与頻度、併用医薬の有無、反応への感受性、および治療に対する耐容/応答などに応じて適宜調節することができる。

本発明はさらに、プロモーター、抗プリオン抗体遺伝子、およびこれに続くポリアデニル化配列を有する核酸構築物を、対象に直接注入することをも企図する。かかる方法の有用な例は、Vile et al. 1994. Ann Oncol 5 Suppl 4:59に記載されている。かかる核酸構築物は、対象の筋肉またはその他の部位、または対象の脳内に直接注入することができる。

[0077] 本発明の別の側面では、間葉系細胞の、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の製造への使用、および、間葉系細胞を含む、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤が提供される。ここで、物質とは、間葉系細胞の内部に挿入できるものや、細胞表面に付着できるものであれば特に限定されず、例えば、異常プリオンの増殖を阻害する物質、細胞の増殖や神経細胞への分化を促進する物質、細胞の生存率を高める物質、細胞の寿命を延長する物質、細胞周期を調節する物質、細胞の遊走能を向上させる物質、神経保護作用を有する物質、アポトーシス抑制効果を有する物質などの、プリオン病の治療効果を高める効果を有する物質のほか、色素、酵素、蛍光物質、放射性同位体などの標識物質、周囲の細胞へ任意の遺伝子を導入するためのベクターなどが包含される。かかる物質の中でも、プリオン病の研究、診断、治療などに有用なものが好ましい。

上記送達剤は、すでに記載した本発明の治療剤と同様の方法で作製し、対象に投与することができる。

実施例

[0078] 本発明を、以下の実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1: 抗PrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

精製したリコンビナントPrP (rPrP)あるいはスクレイピーObihiro株感染マウス脳から精製した異常型プリオンタンパク質(PrP^{Sc})を抗原として、プリオンタンパク質ノックアウトマウス(Prnp^{0/0}マウス)を免疫し、得られた脾臓細胞とミエローマ細胞株(P3U1)とを融合させてハイブリドーマを得、これをPrPとの結合性についてスクリーニングした(Kim et al. 2004. Virology 320:40-51参照)。

[0079] (1) 抗原の調製

大腸菌発現ベクターpRSETB (Invitrogen社製)を用いて、大腸菌にマウスPrPの23～231位に相当する組換えポリペプチド(rPrP)を発現させた。rPrPは封入体中に発現されるので、これを8Mの塩酸グアニジンで可溶化し、Ni²⁺-IMACで精製した。精製物を分子内にSS結合を有するものについて逆相HPLCでさらに精製したrPrPを抗原とした(上記Kim et al. 参照)。

[0080] (2) マウスの免疫

対象動物として10～12週齢のPrnp^{0/0}-マウス(Yokoyama et al. 2001. J Biol Chem 276:11265-11271)を用いた。マウスに上記抗原200 μ gをフロイント完全アジュバントとともに皮下接種した。その後2週間ごとに、上記抗原100 μ gをフロイント不完全アジュバントとともに皮下接種した。最終免疫は上記抗原50 μ gを尾静脈より注射することにより行った。

[0081] (3) 細胞融合およびハイブリドーマの選択

最初の免疫から42日目に、深麻酔下の免疫マウスより脾臓を摘出し、単細胞懸濁液を調製した。得られた細胞をポリエチレングリコール1500を用いてP3U1細胞と融合させた。得られたハイブリドーマの培養上清をrPrPおよび精製PrP^{Sc}を抗原としたELISAによりスクリーニングした。rPrPあるいは精製PrP^{Sc}と反応する抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。

[0082] 実施例2: 抗PrPモノクローナル抗体のPrP^{Sc}増殖阻害活性

実施例1で得られた抗体のうち、PrP^{Sc}増殖阻害活性を有するものを選択した。ブロン持続感染細胞I3/I5 (Race et al. 1987 J Gen Virol 68:1391-9)を0.1～10 μ g/mlの濃度の抗PrPモノクローナル抗体を含む培地で3日間培養した。培地を除去後に、細胞をPBSで洗浄し、0.5% Triton-X100、0.5%デオキシコール酸ナトリウムを含む緩衝液で溶解し、20 μ g/mlのプロテインキナーゼKで37℃にて20分消化した。プロテインキナーゼKの活性を2mMのPefablockを加えて停止した後、100,000×g、2時間の遠心によりPrP^{Sc}を回収した。PrP^{Sc}はウェスタンブロット法により検出した。

[0083] 以下の実施例では、このうちPrP^{Sc}増殖阻害活性を示さなかった43C5 (IgG1)、ならびに、PrP^{Sc}増殖阻害活性を示した72-5 (IgG1、受託番号:FERM P-18516)お

よび44B1 (IgG_{2a}、受託番号:FERM P-18515)の3種のハイブリドーマを用いた。

[0084] 実施例3:抗プリオン抗体遺伝子の同定

(1) 抗体遺伝子のクローニング

実施例2で選択したハイブリドーマから定法に従い全RNAを調製し、5' - RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法およびRT-PCR法にて抗体遺伝子(重鎖、軽鎖)をそれぞれクローニングした。5' - RACE法はSMART(登録商標) RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用いて行った。抗体遺伝子クローニングのために以下に示すプライマーを作製した。図1に抗体遺伝子とプライマーとの対応関係を示す。

[0085] [表1]

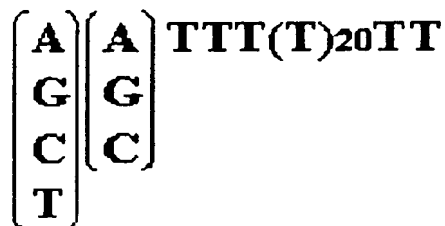
表1 抗PrP抗体遺伝子のクローニングに用いたプライマー一覧

1936 (配列番号 9)	: 35mer 5'- TCACTCGAGGGTGGGAAGATGGATACAGTTGCTGCA -3'
1937 (配列番号 10)	: 32mer 5'- ACCCTCGAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTG -3'
1938 (配列番号 11)	: 36mer 5'- CGCGGATCCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTT -3'
1940 (配列番号 12)	: 23mer 5'- CTTGACCAGGCATCCCAGGGTCA -3'
1941 (配列番号 13)	: 25mer 5'- CCTGGATCTGCTGCCAACTAACT -3'
1942 (配列番号 14)	: 25mer 5'- CGGAAAGTGCTGTTGAACTGCTCCT -3'
1943 (配列番号 15)	: 24mer 5'- AGGTGCACACAGCTCAGACGCAAC -3'
1944 (配列番号 16)	: 33mer 5'- CCGAGATCTCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGG -3'
1980 (配列番号 17)	: 26mer 5'- CGGAGATTTTGCATATTGCAGCAGT -3'
1982 (配列番号 18)	: 28mer 5'- AATAGTCTACAAAATCTTCAGACTCAAG -3'
1999 (配列番号 19)	: 23mer 5'- CAGTCTCACTTGTGCGGCAAGTC -3'
2000 (配列番号 20)	: 26mer 5'- ATCTAAACTGGATGTGGCGTAGATCA -3'
2001 (配列番号 21)	: 23mer 5'- GAGCCAGTGACCTTGACCTGGAA -3'
2002 (配列番号 22)	: 23mer 5'- CACATTGCAGGTGATGGACTGGC -3'
2003 (配列番号 23)	: 25mer 5'- AGTACACAGCTCAGACACAAACC -3'
2004 (配列番号 24)	: 23mer 5'- CTCATCCAGTCCTGGTGCTGGAT -3'
2006 (配列番号 25)	: 24mer 5'- CCGAGATCTCATTTACCCGGAGTC -3'
2007 (配列番号 26)	: 26mer 5'- ATTGTCATTGCGAGTCAGGACTCAGCA -3'
2009 (配列番号 27)	: 24mer 5'- ACTCAGCATGGACATGAGGGCTCC -3'

[0086] RACE用cDNAは、次のようにして調製した。すなわち、43C5、72-5、44B1それぞれの全RNA1 μ gに、5'-CDSプライマー1 μ l、SMART II Λ (登録商標)オリゴヌクレオチド(配列番号7)1 μ l、脱イオン水を加え5 μ lとし、70°Cで2分間加温し、氷中で2分間急冷した。次に5 \times First-Strandバッファー2 μ l、DTT(20mM)1 μ l、dNTPミックス(10mM)1 μ l、PowerScript (登録商標)逆転写酵素1 μ lを加え全量を10 μ lとし、42°Cで90分インキュベートした。次に72°Cで7分間加熱し、5'-RACE用cDNAとした。5'-CDSプライマーは、下表2のものを用いた。

[表2]

表 2



[0087] 抗体の可変領域の5'-RACEは、下記の組成のマスターミックス(表4)およびRACE反応液(表5)を用い、クローンテック社のマニュアルにしたがって作製した。ユニバーサルプライマーとしては、以下の組み合わせからなる混合物(UPM: Universal Primer Λ Mix)を用いた。

[表3]

表 3

Long (0.4 mM): 5' - CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3' (配列番号 8)

Short (2 mM): 5' - CTAATACGACTCACTATAGGGC - 3'

[0088] 5'-RACE用プライマー(GSP: Gene Specific Primer、遺伝子特異的プライマー)としては、1940(43C5、72-5重鎖)、2002(44B1重鎖)および1936(43C5、44B1軽鎖)を用いた。反応は、94°C5秒、72°C3分を5サイクル; 94°C5秒、70°C10秒、72°C3分を5サイクル; 68°C10秒、72°C3分を25サイクルの条件で行った。

[0089] [表4]

表4 マスターミックスの組成

PCR グレードの水	30.5 μ l
10×Advantage-HF 2 PCR バッファー	5 μ l
10×Advantage-HF 2 dNTP ミックス	5 μ l
50×Advantage-HF 2 ポリメラーゼミックス	1 μ l
合計	41.5 μ l

[0090] [表5]

表5 5'-RACE 反応液の組成 (単位: μ l)

	5'-RACE	GAPDH (陽性対照)	UPM のみ (陰性対照)	GSP のみ (陰性対象)
5'-RACE 用 cDNA	2.5	2.5	2.5	2.5
UPM (10×)	5.0	5.0	5.0	
GSP (10 μ M)	1.0			1.0
対照用 5'-RACE GAPDH フライマー (10 μ M)		1.0		
H ₂ O			1.0	5.0
マスターミックス	41.5	41.5	41.5	41.5
最終体積	50.0	50.0	50.0	50.0

[0091] RT-PCRは定法に従って行った。即ち、2 μ lのcDNA、1 μ lの10 μ Mプライマー、4.5 μ lのH₂Oにマスターミックスを加えて50 μ lとした反応液を94℃3分;94℃3秒、65℃3分を30サイクル;65℃3分の条件で反応させた。cDNAは上記の5' RACE用に調製したものをを用いた。RT-PCR用プライマーとしては、1941、1942、1943、1944(43C5、72-5重鎖定常領域)、2001、2003、2004、2006(44B1重鎖定常領域)、1937、1938(43C5、72-5、44B1軽鎖定常領域)および1980、1982、1999、2000、2007、2009(72-5軽鎖可変領域)を用いた。

[0092] 上記のようにして得られた各抗体遺伝子の可変領域および定常領域の増幅産物(cDNA)を、2%アガロースゲルによる電気泳動によりそれぞれ確認し、予想される分子量のバンドを切り出し、ガラスビーズ法にて精製し、TOPO-TAクローニングベクタープラスミドにサブクローニングした。なお、44B1重鎖可変領域はトランスポゾンを含むシュード遺伝子を排除するために、トランスポゾン領域に特異的なXbaIで5'-RACE産物を消化し、分子量が変わらなかった約700bp(44B1VH-700)、800bp(44B1VH-800)の2本のバンドをアガロースゲルより切り出し、サブクローニング

を行った。

[0093] (2)配列決定

上記で得られたプラスミドを、ミニプレップにより、BigDye(登録商標) Terminator cycle Sequencing kitのマニュアルに従って精製した。すなわち、400ngのプラスミド DNAに、4 μ lのBigDye(登録商標)、2 μ lの5×シーケンス用バッファー、3. 2 μ lのシーケンス用プライマー(1pM/ μ l)および適量の脱イオン水を加え20 μ lとし、サーマルサイクラー(Perkin-Elmer GeneAmp(登録商標) System 2400)にてPCR反応を行った(35サイクル:96°C10秒、55°C5秒、60°C4分)。次にPerforma DTRゲル濾過カートリッジで脱塩を行い、スピードバックで溶媒を除去、20 μ lのHi-Diホルムアミドを加え、95°Cで5分間加熱後、氷水中で2分間急冷しシーケンスサンプルを得た。配列決定はABI PRISM 3100を用いて行った。

[0094] この結果、43C5重鎖(43C5H:配列番号1)、43C5軽鎖(43C5L:配列番号2)、72-5重鎖(72-5H:配列番号3)、72-5軽鎖(72-5L:配列番号4)、44B1重鎖(44B1H:配列番号5)、44B1軽鎖(44B1L:配列番号6)の6種の配列を得た。表6に各配列におけるシグナルペプチド領域、可変領域および定常領域を塩基番号で示す。

[表6]

表6 抗プリオン抗体遺伝子の構成

	シグナルペプチド領域	可変領域	定常領域
4 3 C 5 H	116-172	173-527	528-1501
4 3 C 5 L	111-167	168-505	506-827
7 2 - 5 H	74-130	131-476	477-1450
7 2 - 5 L	38-94	95-426	427-748
4 4 B 1 H	149-205	206-559	560-1552
4 4 B 1 L	90-149	150-397	398-806

[0095] 実施例4:抗プリオン抗体遺伝子の発現

(1)発現ベクターへのクローニング

43C5、72-5のIgG1重鎖は、定常領域をEcoRI/XmaIサイトおよびXmaI/BglIIサイトの2パートで切り出しを行った。次に、発現ベクタープラスミドpCAccをEcoRI/BglIIで消化し、これに定常領域(CH1-2)EcoRI/XmaIおよび定常領域(CH2-3)XmaI/BglIIを3パートライゲーションで挿入し、pCAcc/CHを作製した。続

いて、これをEcoRI/BstEIIで消化し、EcoRI/BstEIIサイトで切り出した可変領域のcDNAをEcoRI/BstEIIサイトでライゲーションさせ、発現プラスミドpCAcc/43C5H、pCAcc/72-5Hを作製した。

[0096] 43C5、44B1の κ 軽鎖は、可変領域をEcoRI/XhoIサイトで切り出し、定常領域はXhoI/BamHIサイトで切り出しを行った。これらのインサートcDNAをpCAcc/EcoRI/BglIIIに3パートライゲーションで挿入し、発現プラスミドpCAcc/43C5L、pCAcc/44B1Lを作製した。

72-5 κ 軽鎖は、上記で作製したpCAcc/43C5LをEcoRI/XhoIで消化し、これにEcoRI/XhoIサイトで切り出した可変領域を挿入して発現プラスミドpCAcc/72-5Lを作製した。

44B1IgG_{2a} 重鎖は、可変領域をEcoRI/PstIサイト、定常領域をPstI/BglIIIサイトで切り出し、pCAcc/EcoRI/BglIIIに3パートライゲーションで挿入し、発現プラスミドpCAcc/44B1Hを作製した(図2参照)。

[0097] (2) 抗体の産生

6穴プレートに、293T細胞を 5×10^5 細胞/ウェルで12時間培養した。上記のようにして得られた発現プラスミドをミニプレップで精製し、それぞれの抗体に対応する重鎖と軽鎖についての発現プラスミドをそれぞれ2.5 μ g用意し、lipofectAMINE(登録商標)2000のプロトコルに従いリポフェクション法で293T細胞にコトランスフェクトした。48時間培養後、293T細胞を回収し、可溶化後、還元条件でSDS-PAGEを行った。泳動したゲルをニトロセルロース膜に転写し、西洋ワサビ標識抗マウスIgG抗体を用いて、抗体の発現を確認した。図3に示すように還元条件下で分子量175~180kDaの抗体タンパク質が検出された。

[0098] 別な実験では、トランスフェクト293T細胞により分泌された抗体をサンドイッチELISA法により定量した。上記と同様に各抗体の発現プラスミドで293T細胞をトランスフェクトし、48時間培養後、その上清を採取した。プレートに結合させる固相化抗体として抗マウスIgG抗体を用いた。所定の濃度になるように0.1Mの炭酸バッファー(pH 8.5)にて濃度調整した固相化抗体を50 μ lずつ各ウェルに添加し、37°Cで1時間インキュベートし、プレート表面に結合させた。次いで、プレート表面の非抗原結合部

位をマスクするために、ヤギ血清(ブロッキング剤)を150 μ l/ウェル添加し、37°Cで1時間ブロッキング操作を行った。ブロッキング操作後、0.02%Tween(登録商標)－PBSにて5分×3回、各ウェルを洗浄し、過剰のブロッキング剤を除いた。

- [0099] ブロッキング後のプレートに、前記培養上清および検量線用のマウスIgGを所定の濃度になるように希釈、調製し、各ウェルに50 μ l添加した。37°Cで1時間反応を行い、0.02%Tween(登録商標)－PBSにて5分×3回、各ウェルを洗浄した。次いで、二次抗体として西洋ワサビ標識抗マウスIgG抗体を所定の濃度になるようにヤギ血清で希釈し、添加した。37°Cで1時間反応後、ウェルを洗浄し、発色基質(TMB)を各ウェルに100 μ l添加し、37°Cで15分放置後、反応停止液である1N H_2SO_4 を50 μ l/ウェルで添加し、450nmにて測定した。その結果、44B1、72-5および43C-5の抗体遺伝子でトランスフェクトされた細胞の培養上清中に発現抗体が分泌されていることが示された(表7参照)。

[0100] [表7]

表 7

トランスフェクト細胞により分泌された抗PrP抗体の定量

クローン名	44B1	72-5	43C-5
抗体濃度 (μ g/ml)	230	260	10

[0101] (3)組換え抗体の反応性

トランスフェクト細胞により分泌された抗体のプリオンタンパク質への反応性をサンドイッチELISA法により検討した。図4に示すように、組換え抗体がプリオンタンパク質と反応することが確認された。

[0102] 実施例5:抗プリオン抗体遺伝子含有アデノウイルスの作製

(1)抗プリオン抗体遺伝子含有コスミドの構築

インサートcDNAは実施例4で得たpCAcc/IgH(pCAcc/43C5H、72-5Hおよび44B1H)、およびpCAcc/L(pCAcc/43C5L、72-5Lおよび44B1L)からClaIサイトで抗体遺伝子cDNAを切り出し、グラスミルク法で精製した。コスミドベクターは、RGDファイバー改変型アデノウイルスを発現するpWEAx-F/RGD/ClaI/CIAPを使用した(Nakamura T et al. 2002. Hum Gene Ther 13(5):613-26)。ベク

ター1 μ gにインサートcDNAを1:1~10のmol比で加え、ライゲーション反応を行った。次にGigapack III Gold Packagingキット(Invitrogen社製)を使用し、上記各cDNAを含む6種のコスミド(pWEA α -43C5HL-F/RGD、pWEA α -43C5LL-F/RGD、pWEA α -72-5HL-F/RGD、pWEA α -72-5LL-F/RGD、pWEA α -44B1HL-F/RGD、pWEA α -44B1LL-F/RGD)を作製した(図5参照)。コスミドは制限酵素によるDNAチェック後、500mlスケールで培養を行いNucleoBond BAC100で精製した。

[0103] (2) 抗プリオン抗体遺伝子含有アデノウイルスの作製

各抗プリオン抗体の重鎖遺伝子または軽鎖遺伝子を含むアデノウイルスは、コスミド単独法またはCOS-TPC法により作製した。

1) コスミド単独法

実施例5(1)で得た組換えコスミドDNA20 μ gをPacIで消化した。消化物を、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、20 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。こうして得たPacI消化済みコスミド5 μ gを10cmのシャーレで培養した293T細胞にリポフェクション法でトランスフェクトした。37°C、5%CO₂で一晩培養し、EDTA-PBS(-)を用いて細胞を回収した。回収した細胞懸濁液の原液、3倍希釈液、5倍希釈液のそれぞれをコラーゲンコート96ウェルプレートに播いた。

2) COS-TPC法

組換えコスミドDNA5 μ gとアデノウイルスゲノムDNA-TPC1 μ gをリン酸カルシウム法で293T細胞にトランスフェクトした。37°C、5%CO₂で一晩培養し、EDTA-PBS(-)を用いて細胞を回収した。回収した細胞懸濁液の原液、3倍希釈液、5倍希釈液のそれぞれをコラーゲンコート96ウェルプレートに播いた。

[0104] 3) アデノウイルスの精製

5日後と10日後に、上記で調製した各ウェルに50 μ lの10%FBS-DMEMを加えた。7日目以降、ウイルスが増殖し細胞が変性したウェルをチェックした。数日後すべての細胞が変性したウェルについて、培養液ごと細胞を回収した。回収した細胞は超音波破碎後遠心し、その上清を1次ウイルス液とした。

コラーゲンコート24ウェルプレートにそれぞれ70~100%コンフルエントまで培養し

た293T細胞を準備した。1次ウイルス液の各サンプルを10 μ l/ウェルの割合で、2ウェル分の293T細胞感染させた。数日後すべての細胞が変性したウェルについて、培養液ごと細胞を回収した。回収した細胞液の一部は超音波破碎後遠心し、上清を2次ウイルス液とした。残りの細胞液は遠心後培地を捨て、cell packとし、全DNAを抽出後、制限酵素で消化し、組換えアデノウイルスDNAの構造を確認した。

- [0105] 2次ウイルス液については、10cmシャーレに293T細胞(90%コンフルエント)を準備し、30 μ lの2次ウイルス液を加え感染させた。3~4日後すべての細胞が変性したことを確認し、培養液ごと細胞を回収した。回収した細胞液の一部はcell packとし、全DNAを抽出後、制限酵素で消化し組換えアデノウイルスDNAの構造を確認した。残りの細胞液は超音波破碎後遠心し上清を3次ウイルス液とし、-80℃で保存した。3次ウイルス液については、その後、10cmシャーレに293T細胞(90%コンフルエント)を30枚準備し、30 μ lの3次ウイルス液を加え感染させた。3~4日後すべての細胞が変性したことを確認し、培養液ごと細胞を回収した。超音波破碎後、CsClステップ勾配法でウイルス精製を行った。精製したウイルスは制限酵素を用いたDNAチェック、PCRにより野生型アデノウイルスの混入がないことを確認し精製ウイルスとして-80℃で保存した。

こうして、上記各cDNAを含む6種のアデノウイルスベクター(Ax43C5H、Ax43C5L、Ax72-5H、Ax72-5L、Ax44B1HおよびAx44B1L)を得た。

[0106] 実施例6:間葉系幹細胞(MSC)の調製

(1) マウスMSCの調製

マウス(ICRまたはC57BL/6系統、6週齢、雌)の大腿骨を深麻酔下に摘出し、PBS(-)中で余剰の筋組織を除去した後、大腿骨頭および膝関節直上部を切断し、2mlの培地(2%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン加IMDM)で、骨髓細胞を10cmディッシュ中に洗い出した。得られた骨髓細胞を、70 μ mメッシュを介して50mlチューブ(ファルコン社製)に集め、PBSで洗浄後(1000rpm、10分)、培養用培地(20%熱不活化CSまたはFBS、50 μ M 2-ME、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン加IMDM)中に再懸濁し、6ウェルプレートに播種した(大腿骨1本/ウェル)。細胞を33℃、5%CO₂で24時間培養後、浮遊細胞を除去し、

付着細胞をさらに培養に供した。これ以降は、3～4日ごとに培地交換を行った。継代はトリプシン／EDTAを1ml加え室温で5分間静置後、容易に剥離する細胞を回収し継代した。

- [0107] 次に、上記付着細胞のうちCD45(－)細胞を以下のようにして選択した。まず、培養14(～21)日目の細胞を採取し、2%FCS加IMDMで3回洗浄後、 1×10^7 細胞/mlの濃度で、2%FCS加IMDMに再懸濁した。得られた細胞懸濁液(1ml)に10 μ lのCD45マイクロビーズ液を加え、室温で20分間インキュベートした。その後、AutoMACS(登録商標)(Miltenyi Biotec社製)を用いた磁気細胞分離法により、CD45(－)細胞を分離した。得られた細胞が、CD11b(－)、CD45(－)の間葉系幹細胞(MSC)であることを、FACS分析(図6)および形態学的観察(図7)により確認した。図7より、CD45(＋)細胞のコロニーが比較的広がりのある人型の細胞と、小型の細胞とが入り混じったものであるのに対し、CD45(－)細胞のコロニーが、間葉系幹細胞の特徴である、広がりのある大型の細胞のみの単一な細胞集団となっていることが分かる。

[0108] (2)ヒトMSCの調製

ヒトMSCはKobune M et al. 2003. Experimental Hematology 31:1-8の記載に従って調製した。即ち、健康なヒトボランティアの後腸骨稜から骨髓単核細胞を採取し、150cm²の組織培養用プラスチックフラスコにて一晚インキュベートした。その後、浮遊細胞を洗浄除去し、付着細胞を培養用培地(10%熱不活化ウシ胎児血清加DME M)中、37℃、5%CO₂、湿潤環境下で培養した。

[0109] 実施例7:抗プリオン抗体遺伝子のMSCへの導入

(1)アデノウイルスベクターによる導入

24穴プレートにICRマウス由来のMSC(ICR/MSC)を 5×10^4 細胞/ウェルの濃度で播種し、そこに実施例5で得たAx43C5HおよびAx43C5L、またはAx44B1HおよびAx44B1Lをそれぞれ1500pu/細胞の濃度で加え、共感染させた。48時間培養後、培養上清中の抗体の存在をウェスタンブロット法で評価した。43C5についての結果を図8に示す。また、培養上清中の抗体量は、実施例4と同様にサンドイッチELISA法により定量した。結果を下表8に示す。

[0110] (2) エレクトロポレーションによる導入

ICRマウスまたはヒトMSCを 2×10^5 細胞/ $100 \mu\text{l}$ の濃度で含む細胞懸濁液に、発現プラスミドpCAcc/72-5HおよびpCAcc/72-5L、あるいはpCAcc/44B1HおよびpCAcc/44B1Lを、各プラスミドあたり $2.5 \mu\text{g}$ 加え、ヒトMSC nucleofectorキット(Amaxa Biosystems社製)を用い、製造者のプロトコルに従って、U-23 high transfection efficiency条件下でエレクトロポレーションを行った。得られた細胞を6ウェルプレートに播種し、48時間培養後、培養上清の一部を採取し、IsoStrip(ロッシュダイアグノスティックス社製)にて抗体の発現を確認した(図9)。その後さらに48時間培養後、培養上清中の抗体量を、実施例4と同様にサンドイッチELISA法により定量した。結果を下表8に示す。

[0111] [表8]

表 8

抗プリオン抗体遺伝子導入MSCによる抗プリオン抗体の分泌

(単位： $\mu\text{g} / 10^5$ 細胞/48時間)

	アデノウイルス	エレクトロポレーション	
	ICR/MSC	ICR/MSC	ヒト MSC
43C5	4		
72-5		0.63	2.8
44B1	0.15	0.28	2.8

[0112] 実施例8: プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の作製

(1) 間葉系細胞へのLacZ遺伝子の導入

実施例6(1)で調製したICR/MSCを、24穴プレートに 5×10^3 細胞/ウェルの濃度で播き、 33°C で12時間、 $5\% \text{CO}_2$ 下で培養した。LacZ遺伝子を発現するアデノウイルスベクターAxCAZ3-F/RGDを、0、1000、3000、10000pu/細胞の濃度で、 37°C にて1時間感染させ、48時間後にX-gal染色を行った。その結果、3000pu/細胞以上の濃度で、すべての細胞にLacZ遺伝子が導入されることが確認された(図10)。

[0113] (2) 間葉系細胞へのDsRed遺伝子の導入

DsRed遺伝子の導入にはNucleofector(amaxa biosystems社製)のHuman MSC

nucleofector kitを用いた。即ち、実施例6(1)で調製したICR/ MSCまたは実施例6(2)で調製したヒトMSC 2×10^5 個を100 μ lのトランスフェクションバッファーに懸濁し、DsRed遺伝子を含む2 μ gのpC Δ cc/DsRed発現ベクターを加え、エレクトロポレーション(プログラム:U-23 high transfection efficiency)を行った。得られた細胞を6ウェルプレートに細胞を播き、48時間培養後、FACSにて遺伝子導入効率を検討した。その結果、ヒトMSCで15.84%、ICR/ MSCで5.78%と良好な遺伝子導入効率を得られることが確認できた(図11)。

上記(1)および(2)で得られたMSCは、いずれもプリオン病の病変部位に遊走し得るので、当該部位にLacZ遺伝子やDsRed遺伝子などの所望の遺伝子およびその遺伝子産物を送達することができる。

[0114] 実施例9:抗プリオン抗体の海綿状脳症抑制効果

プリオン病モデルマウスを用いて、抗プリオン抗体72-5および44B1の海綿状脳症抑制効果を評価した。対象には、4週齢の雌ICRマウス(日本クレア株式会社)を用いた。対象に、スクレイパーobihiro株(北海道大学より入手)の10%脳乳剤2 μ lを脳内投与した。この処置により、通常60~90日後頃から脳内にPrP^{Sc}が検出されるようになる(ウェスタンブロット法では60日後以降、免疫組織化学法では90日後以降)。いずれの対象も、投与後125日までには、運動失調などの典型的な海綿状脳症の症状を発症した。臨床的に中期に分類される投与後137~144日目に、72-5、44B1またはKLHの各抗体を、Alzet(登録商標)浸透圧ポンプを用いて、それぞれ別個の対象の背側第三脳室内に注入した(200 μ l/週、28 μ g/マウス/日)。なおKLHは、抗KLH(スカシ貝ヘモシアニン)抗体(富士レビオ)を意味し、陰性対照として用いた。陰性対照が、消瘦、起立不能などの末期の臨床症状を呈したら、対象を安楽死させ、脳組織試料を採取した。採取した組織は、組織学的分析、およびウェスタンブロット法に供し、脳組織の状態およびPrP^{Sc}の蓄積量をそれぞれ評価した(結果を図12および図13にそれぞれ示す)。

[0115] 図12から明らかなとおり、陰性対照であるKLHを投与した対象の脳組織(視床)には、海綿状脳症に特徴的な空洞が多数認められるのに対し、72-5または44B1を投与した対象の同様の脳組織においては、かかる空洞が殆ど見られなかった。また、

72-5または44B1を投与した対象では、脳組織中のPrP^{Sc}の蓄積量が、KLH投与対象に比べて明らかに減少していた(図13参照)。したがって、72-5、44B1等の抗プリオン抗体が、PrP^{Sc}の蓄積の蓄積を防ぐと共に、海綿状脳症病変の発生を抑制し得ることが明らかとなった。

[0116] 実施例10:MSCの生着

プリオン病モデルマウスを用いて、MSCの脳への生着能を評価した。対象には、実施例9に記載の処置を施したICRマウス(感染マウス)と、対照としてかかる処置を施していないICRマウス(非感染マウス)とを用いた。PrP^{Sc}投与後140日目に、対象の視床に、実施例8で作製したLacZ発現MSCを 1×10^4 個移植した。PrP^{Sc}投与後142日目にマウスを安楽死させ、脳組織にX-gal染色を施し、MSCの分布を評価した。図14に示すとおり、いずれの対象においても、移植したMSCが移植局所に生着していることが判明した。したがって、実施例9および10の結果から、実施例7で得た抗プリオン抗体分泌MSCをプリオン病モデルマウスに移植することにより、プリオン病の改善が期待できる。

[0117] 実施例11:マウス-ヒトキメラ抗体の作製

実施例3で得た各マウス抗プリオン抗体(43C5、72-5および44B1)をコードする核酸配列をもとに、これらの抗体の定常領域をヒトのものと置換したマウス-ヒトキメラ抗体(m/h43C5、m/h72-5およびm/h44B1)を作製した。ヒト抗体の定常領域をコードする核酸は、Shibagaki et al. 1998 Eur J Immunol 28:1125-1133およびShibagaki et al. 1998 Eur J Immunol 29:4081-4091に記載の方法で得た。すなわち、テンプレートとしてヒト-マウスキメラモノクローナル抗体L6を産生するミエローマ細胞株からのRNAを、フォワードプライマーとして配列番号28のオリゴヌクレオチドを、そしてリバースプライマーとして配列番号29のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたRT-PCR法にて所望の核酸を得た(Linsley et al. 1991 J Exp Med 173:721-30参照)。こうして得た核酸の上流に、表6に示す各マウス抗体のシグナルペプチド領域および可変領域をコードする核酸を連結することによりマウス-ヒトキメラ抗体をコードする核酸を得、配列を決定した。各抗体をコードする核酸配列およびアミノ酸配列は下表9の通りである。

[0118] [表9]

	核酸配列	アミノ酸配列
m/h 4 3 C 5 重鎖	配列番号 3 0	配列番号 3 6
m/h 4 3 C 5 軽鎖	配列番号 3 1	配列番号 3 7
m/h 7 2 - 5 重鎖	配列番号 3 2	配列番号 3 8
m/h 7 2 - 5 軽鎖	配列番号 3 3	配列番号 3 9
m/h 4 4 B 1 重鎖	配列番号 3 4	配列番号 4 0
m/h 4 4 B 1 軽鎖	配列番号 3 5	配列番号 4 1

上記核酸は、例えば、実施例4と同様の手順により発現させることができ、また、実施例7と同様の方法でMSCに導入し、発現させることができる。

[0119] 実施例12:MSC細胞のプリオン病改善効果および患部への遊走能

実施例9に記載のプリオン病モデルマウスに、海綿状脳症発症後(スクレイピー obihiro株接種の125日後以降)、実施例7で得た抗プリオン抗体遺伝子発現MSCもしくは実施例8で得たLacZ発現MSCを、それぞれ例えば 1×10^4 個静脈内投与する。2～20日後に、一部のマウスを安楽死させ、実施例9と同様に脳組織を採取し、組織学的分析、およびウェスタンブロット法に供し、各マウスの脳組織の状態およびPrP^{Sc}の蓄積量をそれぞれ評価するとともに、残りのマウスについては、臨床状態の変化を観察する。これにより、MSC細胞のプリオン病改善効果を容易に確認することができる。また、上記で採取した脳組織に、実施例10と同様にX-gal染色を施し、MSCの分布を調査することにより、MSC細胞のプリオン病患部への遊走能を確認することができる。

[0120] 実施例13:抗プリオン抗体遺伝子含有ベクターおよび抗プリオン抗体分泌MSC細胞のプリオン病改善効果

実施例5で得た抗プリオン抗体遺伝子含有アデノウイルス(例えば 5×10^8 粒子)、または、実施例7で得た抗プリオン抗体遺伝子発現MSC(例えば 1×10^4 個)を、実施例9に記載のプリオン病モデルマウスに、海綿状脳症発症後(スクレイピー obihiro株接種の125日後以降)脳内投与する。2～20日後に、一部のマウスを安楽死させ、実施例9と同様に脳組織を採取し、組織学的分析、およびウェスタンブロット法に供し、各マウスの脳組織の状態およびPrP^{Sc}の蓄積量をそれぞれ評価する。残りのマウ

スについては、臨床状態の変化を観察する。これにより、上記アデノウイルスまたはMSC細胞のプリオン病改善効果を容易に確認することができる。

請求の範囲

- [1] 間葉系細胞を有効成分として含む、プリオン病の治療のための剤。
- [2] 間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、請求項1に記載の剤。
- [3] 間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する抗プリオン抗体の遺伝子が導入されたものである、請求項1または2に記載の剤。
- [4] 抗体遺伝子が、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなり、抗体重鎖遺伝子が、
、
(1a)配列番号1、3、5、30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸、
、
(1b)遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(1c)前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(1d)前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、
(2a)配列番号2、4、6、31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸、
、
(2b)遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(2c)前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(2d)前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、請求項1～3のいずれかに記載

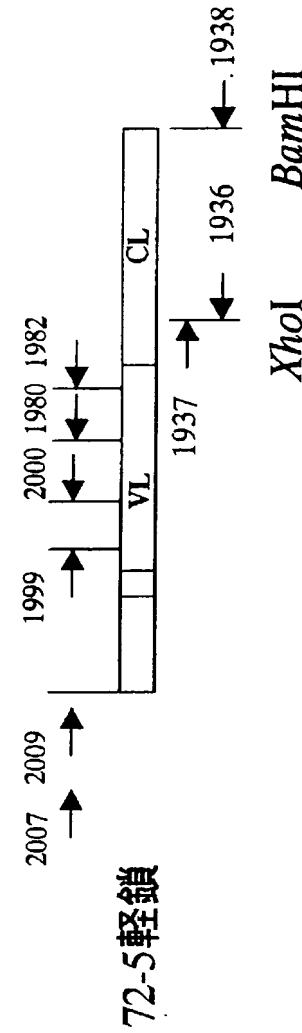
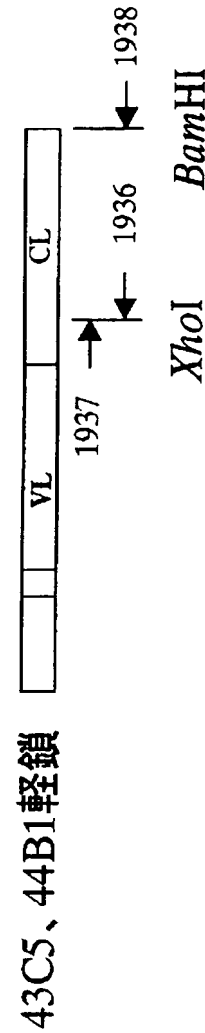
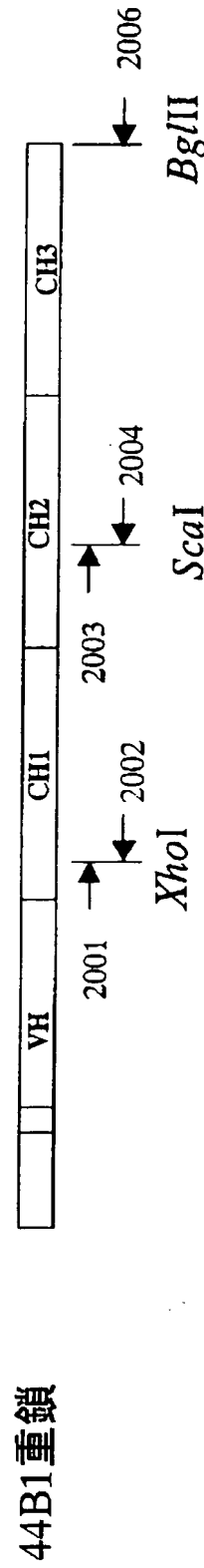
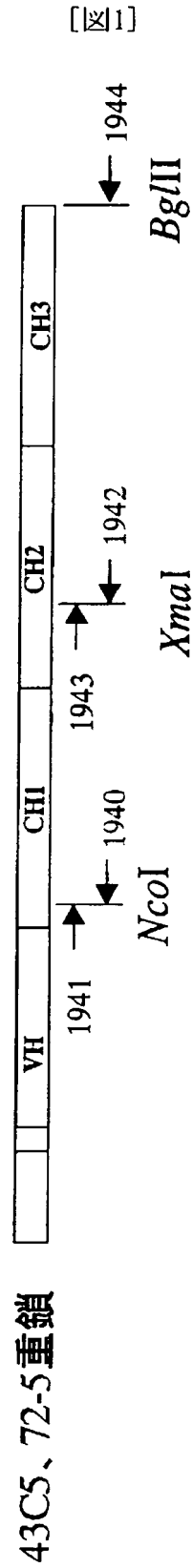
の剤。

- [5] 静脈内投与用である、請求項1～4のいずれかに記載の剤。
- [6] 間葉系細胞が骨髄細胞、臍帯血細胞および末梢血細胞からなる群から選択される、請求項1～5のいずれかに記載の剤。
- [7] 抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなる抗プリオン抗体遺伝子であって、抗体重鎖遺伝子が、
(1a)配列番号1、3、5、30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸、
(1b)遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(1c)前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(1d)前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、
(2a)配列番号2、4、6、31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸、
(2b)遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(2c)前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(2d)前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、前記抗プリオン抗体遺伝子。
- [8] 請求項7に記載の抗プリオン抗体遺伝子を含むベクター。

- [9] RGD配列を含むアデノウイルスベクターである、請求項8に記載のベクター。
- [10] 請求項7に記載の抗プリオン抗体遺伝子によりコードされる抗体の可変領域と、マウス以外の動物の抗体の定常領域とを含む、抗プリオンキメラ抗体。
- [11] (1a)配列番号30、32および34からなる群から選択される配列を含む核酸、
(1b)遺伝子コードの縮重により前記(1a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(1c)前記(1a)または(1b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(1d)前記(1a)～(1c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択される抗体重鎖遺伝子、および、
(2a)配列番号31、33および35からなる群から選択される配列を含む核酸、
(2b)遺伝子コードの縮重により前記(2a)の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、
(2c)前記(2a)または(2b)の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(2d)前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択される抗体軽鎖遺伝子によりコードされる、請求項10に記載の抗プリオンキメラ抗体。
- [12] 請求項10または11に記載の抗プリオンキメラ抗体をコードする核酸。
- [13] 細胞に、異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子を導入することを含む、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法。
- [14] 異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子が、抗プリオン抗体遺伝子である、請求項13に記載の方法。
- [15] 細胞に、請求項8または9に記載のベクターを介して、請求項7に記載の遺伝子を

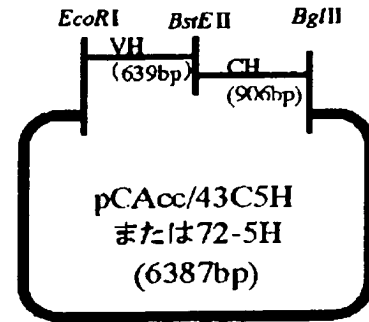
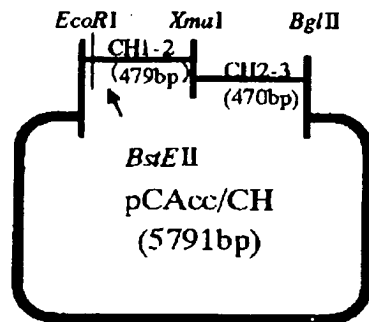
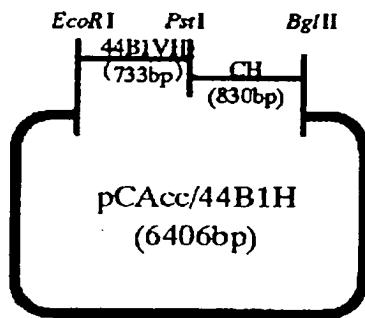
導入することを含む、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法。

- [16] 細胞が、間葉系細胞である、請求項13～15のいずれかに記載の方法。
- [17] 請求項13～16のいずれかの方法で作製された、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞。
- [18] 請求項16に記載の方法を含む、プリオン病の治療のための剤の製造方法。
- [19] 抗プリオン抗体を放出する、プリオン病治療用持続製剤。
- [20] 抗プリオン抗体が、請求項7に記載の核酸によりコードされる抗体、および／または、請求項10または11に記載の抗プリオンキメラ抗体である、請求項19に記載の製剤。
- [21] 浸透圧ポンプの形態である、請求項19または20に記載の製剤。
- [22] 抗プリオン抗体分泌細胞を含む、請求項19または20に記載の製剤。
- [23] 抗プリオン抗体分泌細胞が、請求項17に記載の細胞である、請求項22に記載の製剤。
- [24] 請求項1～6のいずれかに記載の剤、請求項8または9に記載のベクター、請求項10または11に記載の抗プリオンキメラ抗体および請求項19～23のいずれかに記載の製剤からなる群から選択される治療剤の治療有効量を投与することを含む、プリオン病を治療する方法。
- [25] 抗プリオン抗体を持続放出することを含む、プリオン病を治療する方法。
- [26] 請求項19～23のいずれかに記載の製剤および／または請求項8もしくは9に記載のベクターを投与することを含む、請求項25に記載の方法。
- [27] 抗プリオン抗体遺伝子を対象の細胞に導入することを含む、請求項25に記載の方法。
- [28] 間葉系細胞の、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の製造への使用。
- [29] 間葉系細胞を含む、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤。
- [30] 間葉系細胞を用いて、プリオン病の病変部位に物質を送達する方法。

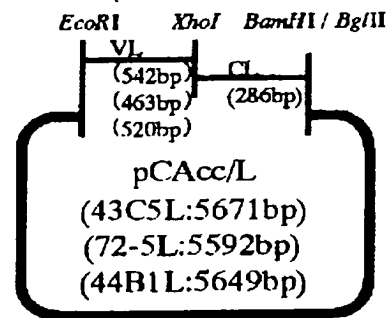


[図2]

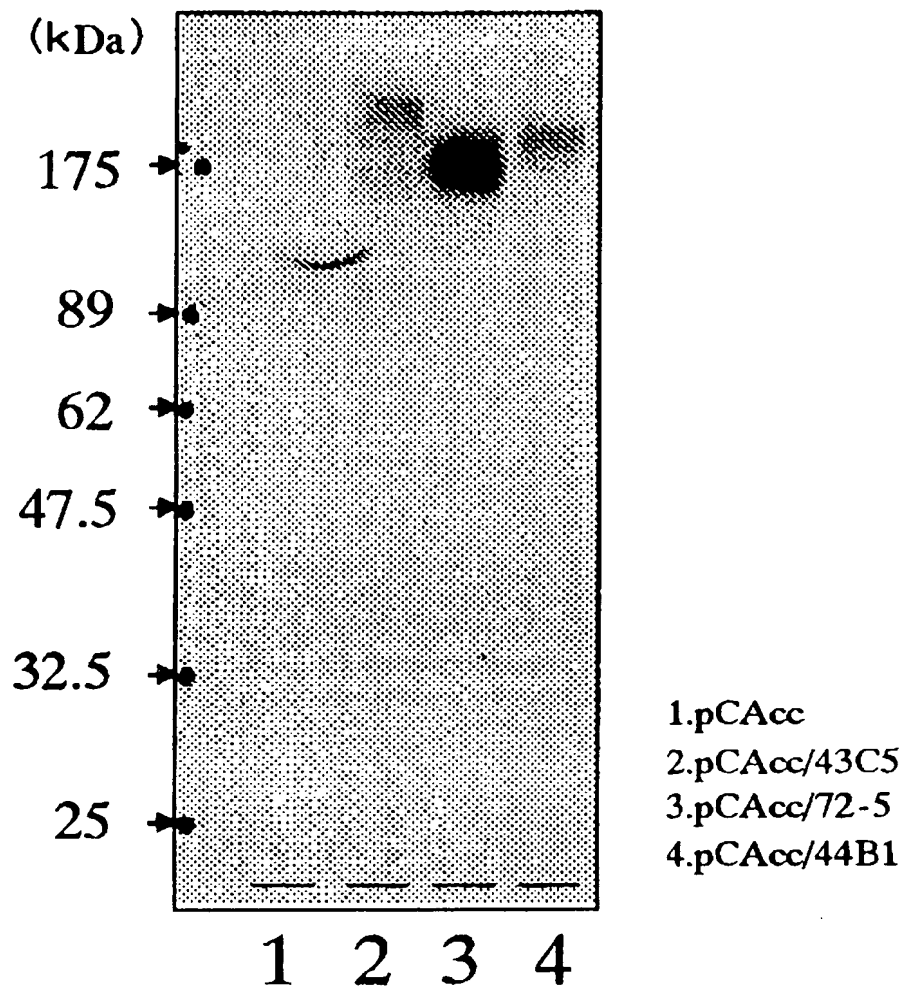
IgG1 重鎖(43C5、72-5)

IgG_{2a} 重鎖(44B1)

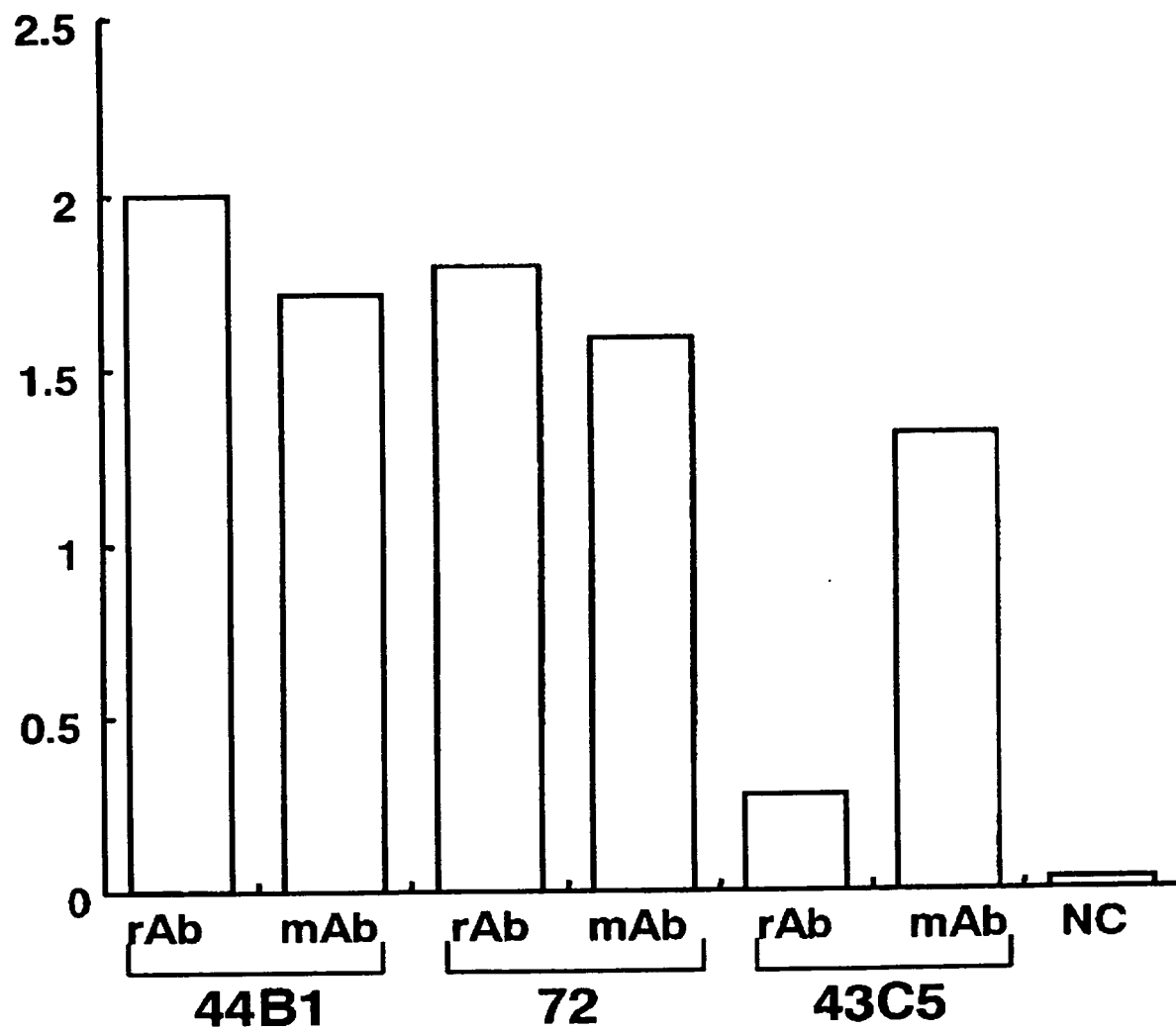
κ 軽鎖(43C5、72-5、44B1)



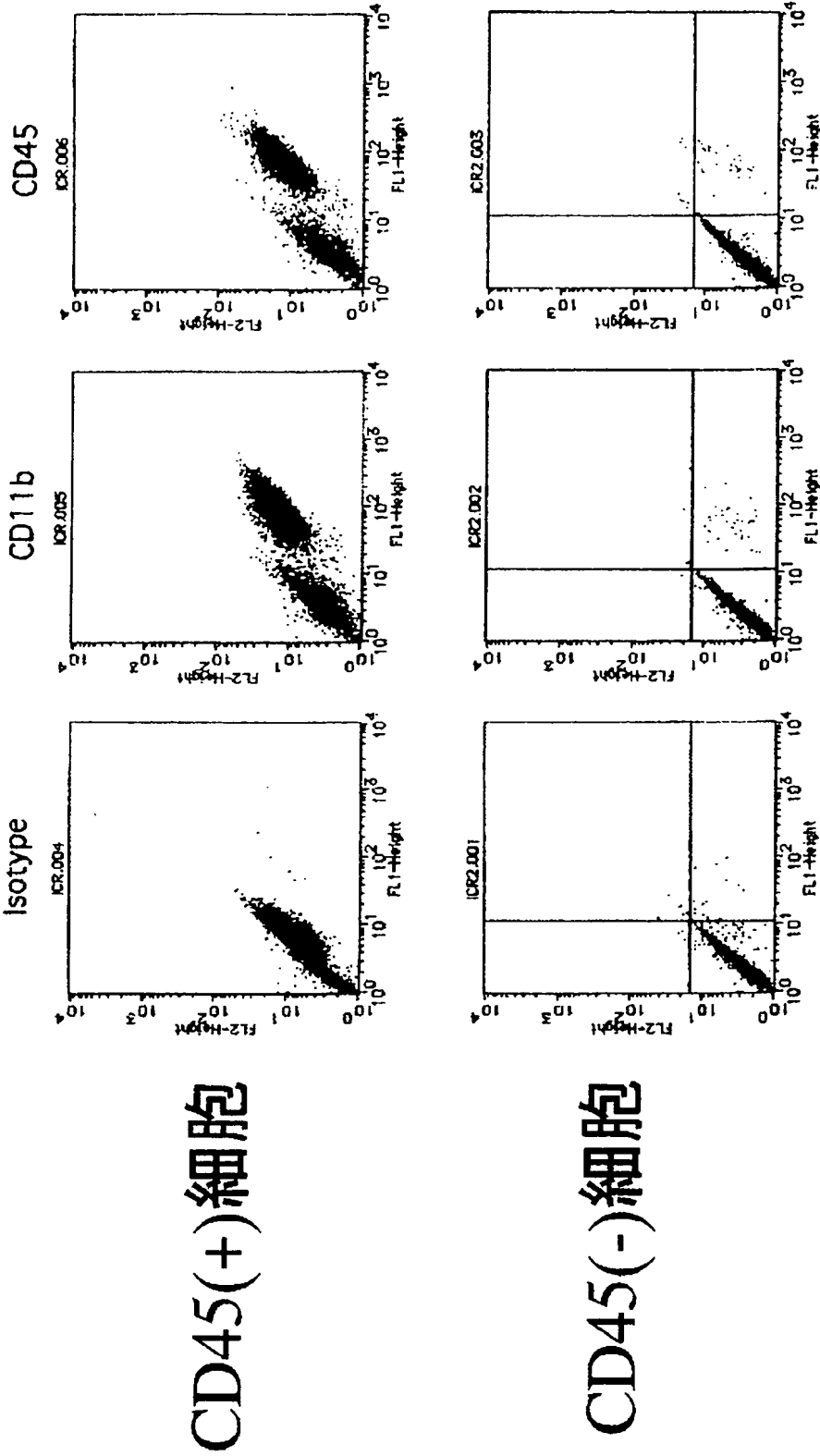
[図3]



[図4]



[図6]



[図7]

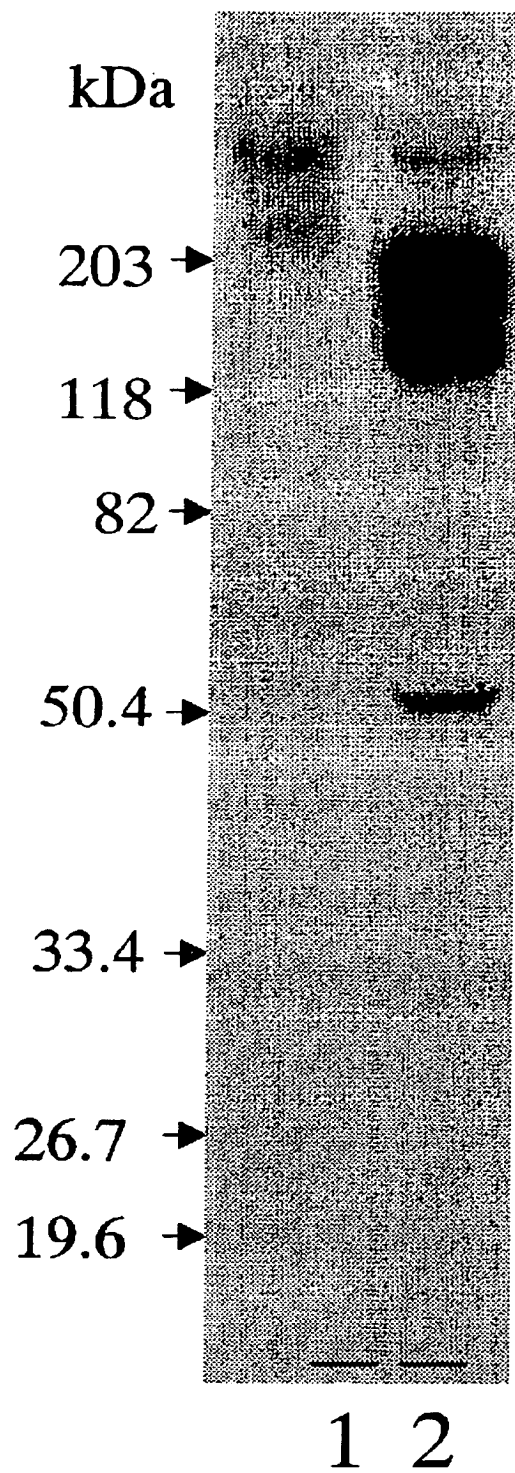


CD45(-)細胞



CD45(+)細胞

[図8]



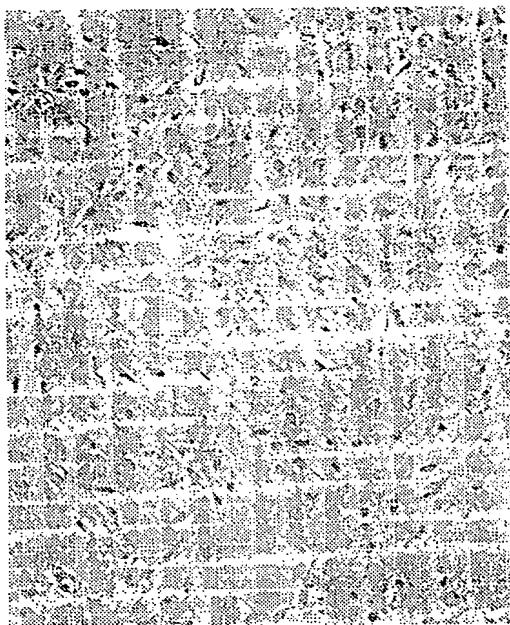
[図10]



3000



10000



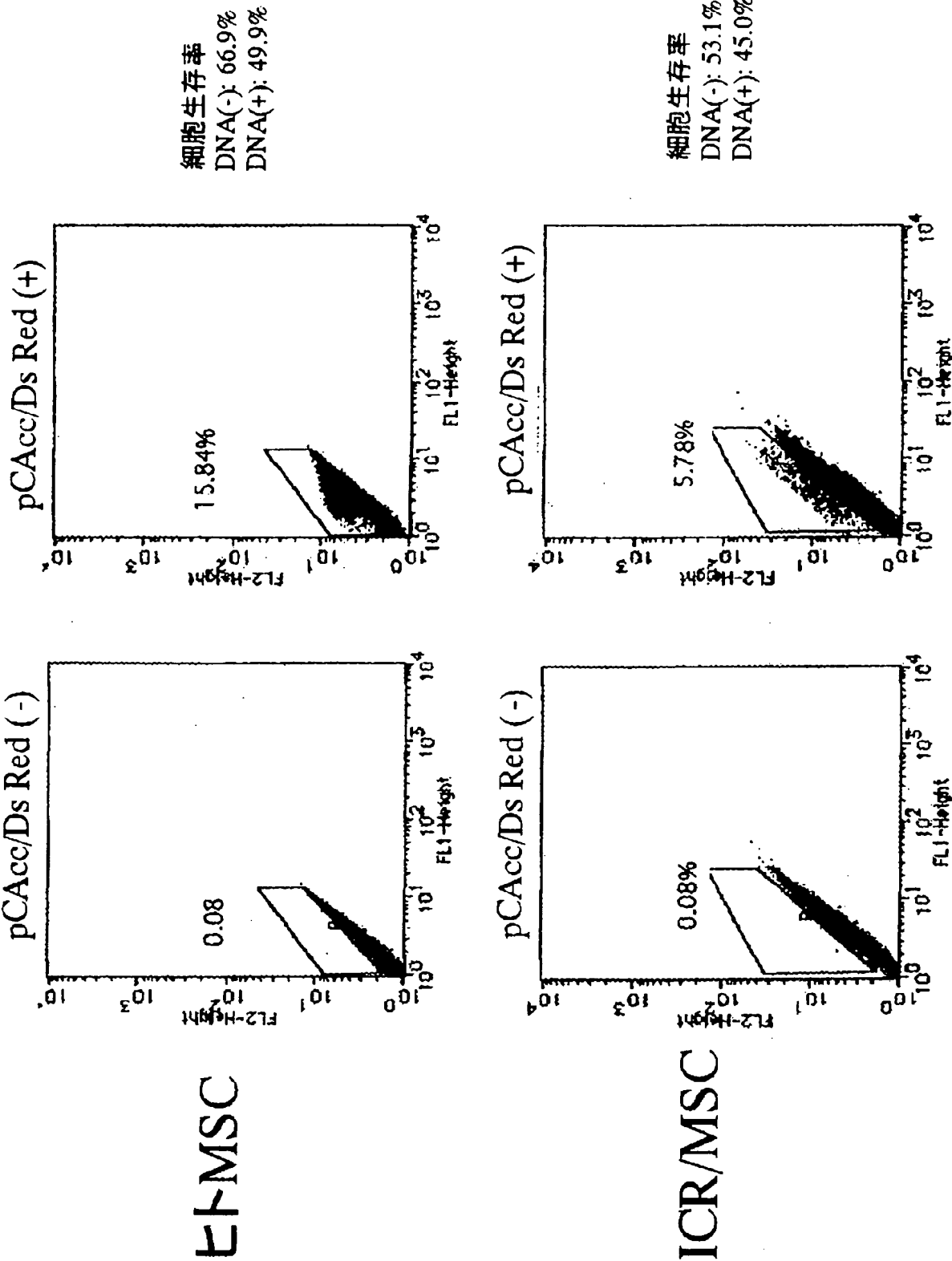
0



1000

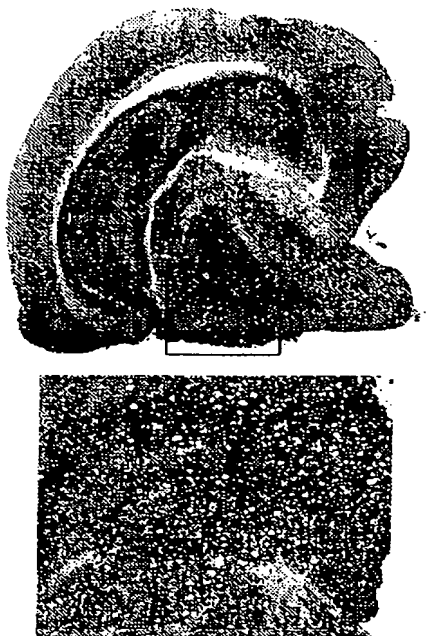
pu / 細胞

[図11]

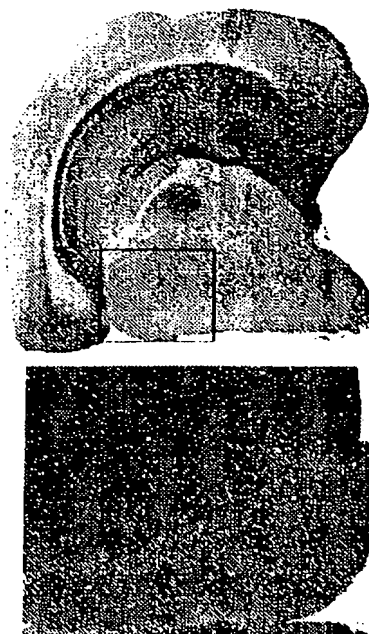


[図12]

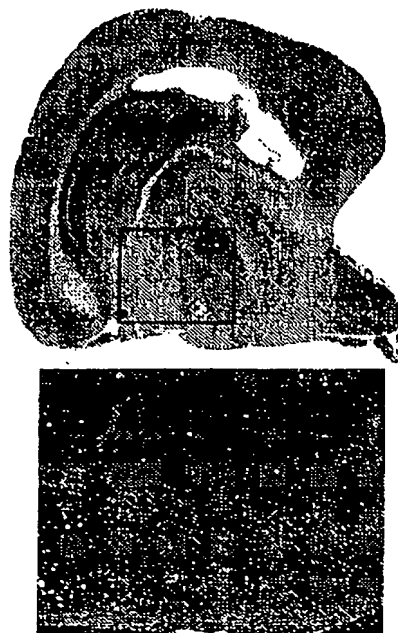
KLH
注入開始:138日目
終了:164日目



72-5
注入開始:137日目
終了:169日目



44B1
注入開始:144日目
終了:163日目

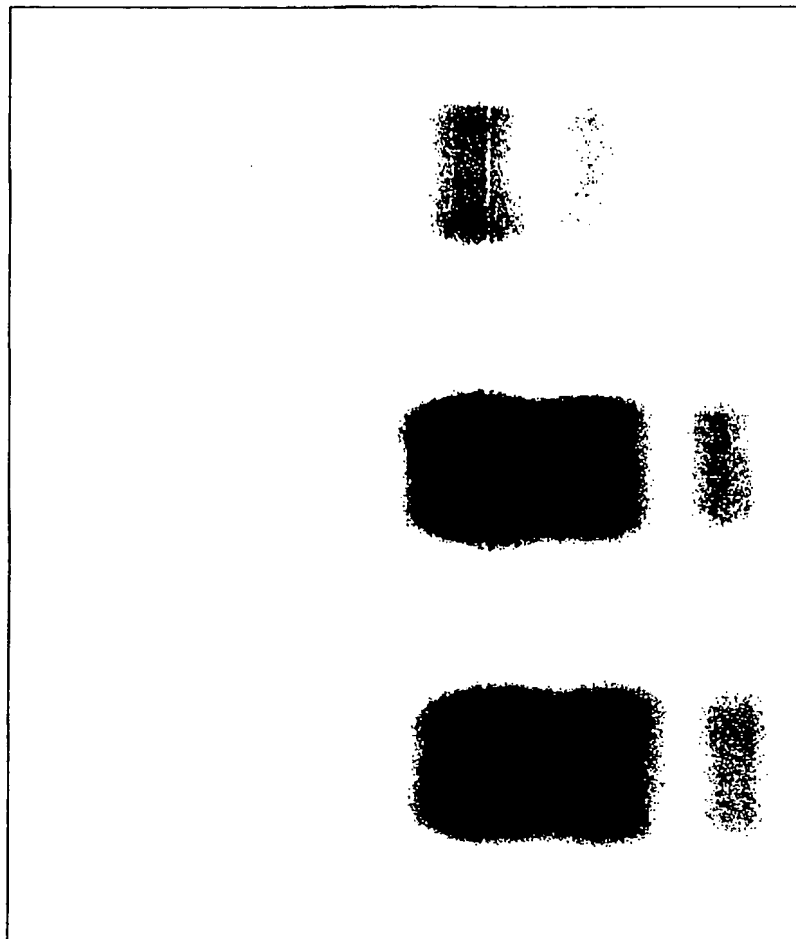


[図13]

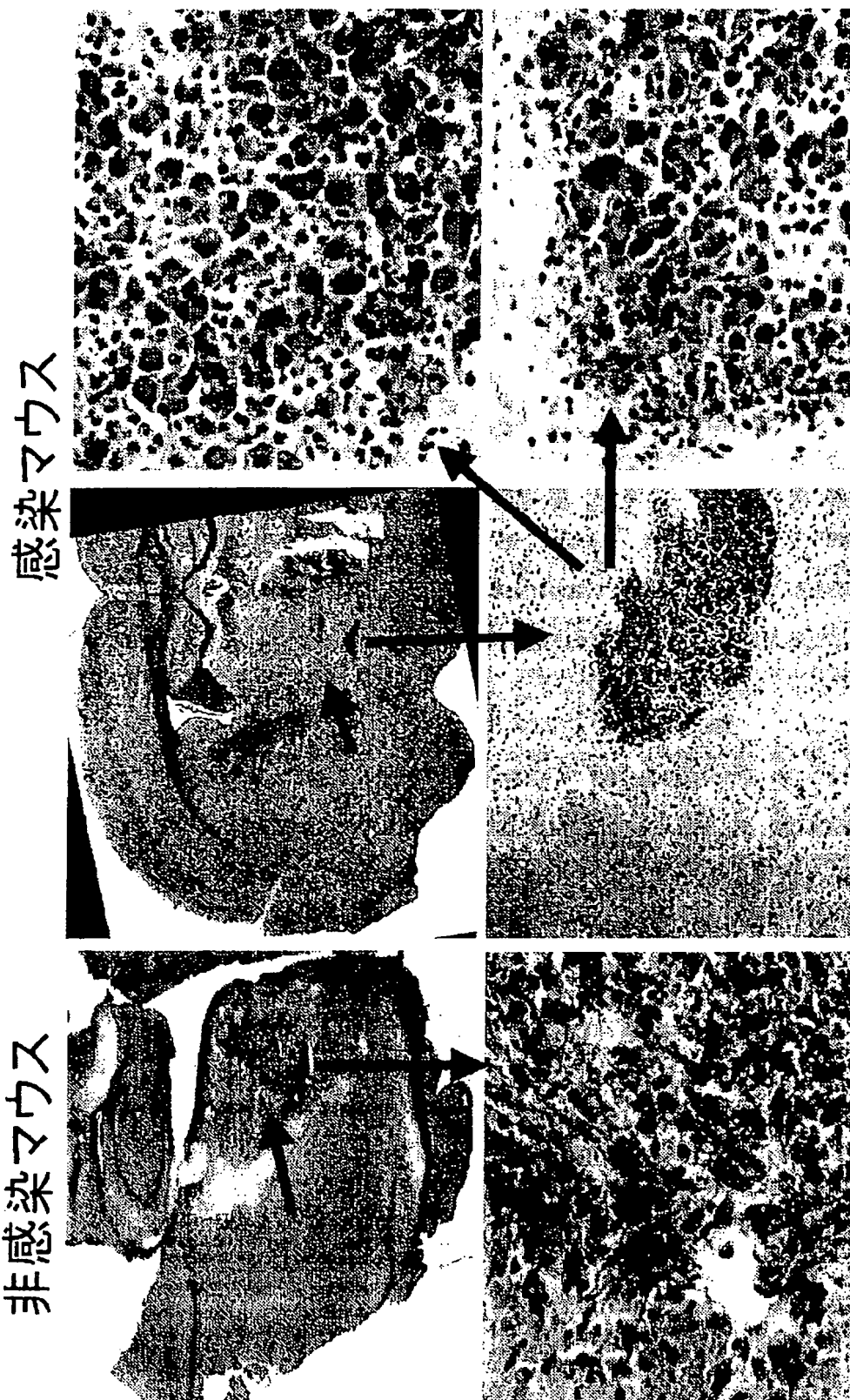
44B1
(0.37)

72-5
(0.93)

KLH
(1.00)



[図14]



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷

A61K35/12, 39/395, 48/00, A61P25/00, C07K16/46, C12N5/10, 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷

A61K35/12, 39/395, 48/00, A61P25/00, C07K16/46, C12N5/10, 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAP(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPIDS(STN), JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	HEPPNER, FL ET AL. 'PREVENTION OF SCRAPIE PATHOGENESIS BY TRANSGENIC EXPRESSION OF ANTI-PRION PROTEIN ANTIBODIES.' SCIENCE, (2001) VOL.294 NO. 5540 P.178-182 文献全体	7-15, 17-27 1-6, 16, 28, 29
X Y	WHITE, AR ET AL. 'MONOCLONAL ANTIBODIES INHIBIT PRION REPLICATION AND DELAY THE DEVELOPMENT OF PRION DISEASE.' NATURE, (2003) VOL.422 NO.6927 P.80-83 文献全体	7-15, 17-27 1-6, 16 28, 29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.07.2005

国際調査報告の発送日

26.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保 元浩

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	KUROZUMI, K. ET AL. 'BDNF GENE-MODIFIED MESENCHYMAL STEM CELLS PROMOTE FUNCTIONAL RECOVERY AND REDUCE INFARCT SIZE IN THE RAT MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCULUSION MODEL.' MOL. THER., (2004 FEB.) VOL.9 NO.2 P.189-187 文献全体	1-6, 16, 28, 29
Y	TSUDA, H. ET AL. 'EFFICIENT BMP2 GENE TRANSFER AND BONE FORMATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS BY A FIBER-MUTANT ADENOVIRAL VECTOR.' MOL. THER., (2003) VOL.7 NO.3 P.354-365 文献全体	1-6, 16, 28, 29
Y	KOBUNE, M. ET AL. 'TELOMERIZED HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL CELLS CAN DIFFERENTIATE INTO HEMATOPOIETIC AND COBBLESTONE AREA-SUPPORTING CELLS.' EXP. HEMATOL., (2003) VOL.31 NO.8 P.715-722 文献全体	1-6, 16, 28, 29

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 24-27, 30 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 24-27, 30 は、治療による人体の処置方法に係る態様を含むものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.